

**Diagnóstico molecular de *Leishmania Canina* mediante la técnica de
reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la ciudad de Neiva.**

Presentado Por:

Irina Yahararodríguez Amar

Cod: 5013214158

Samira Vanesa Burbano Guevara

Cod: 5012213225

**Corporación Universitaria del Huila
Facultad de Medicina Veterinaria y Ciencias Afines
Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Neiva - Huila
2019**

Diagnóstico molecular de *Leishmania Canina* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la ciudad de Neiva.

PRESENTADO POR:

IRINA YAHARA RODRÍGUEZ AMAR

Cod: 5013214158

SAMIRA VANESA BURBANOGUEVARA

Cod: 5012213225

Director: WILMER ANDRES RAMOS EMBUS

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Médico Veterinario Zootecnista**

**CORPORACIÓN UNIVERSITARIA DEL HUILA “CORHUILA”
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y CIENCIAS AFINES
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTEKNIA
NEIVA - HUILA
2019**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma de jurado

Firma de jurado

Neiva, Huila, Febrero 2019

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	5
1. JUSTIFICACIÓN.....	6
2. OBJETIVO GENERAL.....	9
2.1. Objetivos Específicos.....	9
3. MARCO TEÓRICO.....	10
4. METODOLOGÍA.....	16
4.1 Tipo de estudio.....	16
4.2 Población.....	16
4.3 Tamaño de la muestra.....	16
4.4 Fases o momentos de la investigación.....	16
4.6 Equipos y Materiales.....	17
4.7 Materiales.....	17
5. EXTRACCIÓN DE ADN EN SANGRE CON EL KIT QIAAMP DNA MINI AND BLOOD.....	23
5.1 Procedimiento.....	23
6. CUANTIFICACIÓN DE ADN DE LAS MUESTRAS.....	27
7. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR.....	33
8. PREPARACIÓN DE GEL DE AGAROSA PARA ELECTROFORESIS.....	35
9. ELECTROFORESIS EN GEL.....	38
10. RESULTADOS.....	41
11. CONCLUSIONES.....	48
12. BIBLIOGRAFÍA.....	49

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa, producida por varias especies del protozoo del género *Leishmania* *infantum*/chagasi. Siendo algunos vertebrados los reservorios de esta enfermedad entre ellos tenemos perros, zorros, ratas etc. Esta enfermedad es considerada zoonótica ya que el ser humano se contagia mediante la picadura de un díptero al picar un reservorio anteriormente. La Leishmaniasis se considera una enfermedad reemergente, y un problema creciente de salud pública en el mundo, debido al aumento de la cantidad de afectados como consecuencia de la mayor exposición de las personas a los vectores de la enfermedad. Los caninos sufren la enfermedad y también la transmiten debido a su estado de reservorio de esta parasitosis y por ello el manejo de la enfermedad tiene las connotaciones clínicas del perro como paciente y las epidemiológicas como fuente de infección para los humanos (Gómez et al. 2011).

El siguiente trabajo se desarrolló en el laboratorio de biología molecular de la Corporación Universitaria del Huila, procesando 150 muestras de diferentes clínicas veterinarias de la ciudad de Neiva.

El objetivo es detectar infecciones inaparentes por *Leishmania* en perros provenientes de zonas urbanas cercanas al hábitat natural del vector, mediante la técnica de PCR, siendo esta técnica más sensible identificando el ADN del agente causal, indicando el riesgo al que puede estar la población humana del sector proveniente de la muestra (vivienda del perro).

Con este trabajo podemos realizar nuestro proyecto de grado como médicos veterinarios zootecnistas, aplicando técnicas y procedimientos de avanzada en busca del ADN de un agente infeccioso en caninos.

1. JUSTIFICACIÓN

Para WHO (2007) según la Organización Mundial de la Salud la Leishmania está catalogada como una de las enfermedades más importantes para el “programa especial de investigación y formación en enfermedades infecciosas” (TDR) y la señala como prioritaria para la investigación y el control.

Debido a la alta incidencia de la enfermedad de Chagas y de la leishmaniasis en una gran variedad de zonas endémicas, y tomando en cuenta el riesgo que presenta tanto para los seres humanos como para otras especies de mamíferos que actúan como reservorios naturales de estos parásitos, es de suma importancia atender con medidas de prevención a las poblaciones que se encuentran con más alto riesgo de sufrir la enfermedad. Para ello, es necesario desarrollar métodos de diagnóstico eficaces que tengan la sensibilidad y la especificidad adecuadas para hacer un diagnóstico fiable a tiempo, y así poder brindar un tratamiento que permita a los individuos afectados recuperarse y de esta forma disminuir las posibilidades de contagio de la enfermedad, debido al ciclo de vida del agente que la causa. (López, 2013).

En Colombia la leishmaniasis es considerada una zoonosis endémica debido a la diversidad de ambientes que tiene siendo las partes húmedas, selváticas y riveras de ríos el hábitat ideal para el desarrollo del agente infeccioso, Zambrano, C. Gutiérrez, P. (2011). Bajo esta apreciación se hace importante realizar este tipo de trabajos en la ciudad de Neiva ya que este presenta una diversidad similar a la expuesta por el autor.

La leishmaniasis que afecta a los humanos es considerada un problema de interés en salud pública debido a su alta morbilidad que presenta en su forma clínica cutánea, por las secuelas y complicaciones de la afectación mucosa y por el riesgo de mortalidad de la forma visceral. (Zambrano, 2011).

Durante la última década se ha identificado una tendencia sostenida hacia al aumento de los casos totales de la enfermedad. En el lapso 2000-2003, el promedio

de casos fue de 6.000, incrementándose a 15.000 casos, en promedio, en los años 2004-2010. La distribución por forma clínica se ha mantenido, siendo el 98% de leishmaniasis cutánea, y el restante 2% de las formas mucosa y visceral. Durante los últimos 5 años, los departamentos que mayor número de casos registraron fueron: Guaviare, Meta y Caquetá que corresponde al área donde ha tomado lugar, principalmente, el conflicto armado, y su alta deforestación e invasión de nuevos territorios por parte de colonos; entre otros departamentos tenemos a Antioquia, Tolima, Santander, Norte de Santander, Boyacá y Nariño, departamentos históricamente endémicos. (Zambrano, 2011).

Según Añez(2012) en el estado de Falcón - Venezuela examino un total de 67 perros serológicamente para detectar infección por Leishmania en 51 de ellos (76,1%) fueron registrados Ac circulantes anti-L. infantum en, al menos, dos de las tres pruebas serodiagnósticas utilizadas, lo cual permitió diagnosticarlos como seropositivos. Los hallazgos serológicos fueron corroborados con la reactividad a los ensayos de PCR del 30% de las muestras procesadas, lo cual evidencia la infección por LV en los perros del área estudiada. En general, los perros presentaban cuadros apreciables de desnutrición, algunos con pelo hirsuto e hipertrofia ungueal, lo que podría estar asociado al resultado serológico detectado. Añez. 2012 encontró alto porcentaje de infección detectado simultáneamente en las poblaciones humana (17%), canina (76%) y flebotomina (5,7%), aporta elementos importantes que permite la comprensión de una manera global del ciclo de transmisión de la LV en el semiárido noroccidental venezolano.

Casi la totalidad de los reportes se han originado en zonas endémicas para leishmaniasis, aunque hay un caso de leishmaniasis felina por L. infantum en una región del estado de Sao Paulo, Brasil, donde hasta el momento no se habían registrado casos autóctonos en humanos o en perros (Savani et al., 2004). Sin embargo, solo a partir de las últimas décadas del siglo anterior se han venido caracterizando detalladamente los hallazgos clínicos, incluyendo la tipificación de la especie de Leishmania causante de la enfermedad. Las especies que han sido

identificadas en los gatos afectados son *L. mexicana* en Estados Unidos (Barnes, Stanley, & Craig, 1993; Craig, Barton, Mercer, Droleskey, & Jones, 1986), *L. venezuelensis* (Bonfante-Garrido, Urdaneta, Urdaneta, & Alvarado, 1990), *L. braziliensis* (Passos, Lasmar, Gontijo, Fernandes, & Degrave, 1996), *L. infantum* (Savani et al., 2004) y *L. amazonensis* (de Souza et al., 2005) en Brasil, y *L. infantum* en Francia e Italia (Ozon et al., 1998; Poli et al., 2002). Generalmente, la tipificación de las especies se realizó por medio de cultivo del parásito e isoenzimas; a partir de la década de los noventa, empezaron a aparecer tipificaciones por métodos moleculares (Passos, Lasmar, Gontijo, Fernandes, & Degrave, 1996; Poli et al., 2002; Savani et al., 2004)

Por consiguiente ante lo reportado previamente el siguiente trabajo ofrece una alternativa para el desarrollo de investigaciones futuras aplicando la técnica de PCR en diferentes enfermedades que afectan a los animales, el cual nos ha servido como opción de grado para la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista.

2. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar la técnica de PCR en muestras sanguíneas para detectar infecciones por *Leishmania* en perros provenientes de zonas urbanas cercanas al hábitat natural del vector de la ciudad de Neiva.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar la Técnica de PCR de Leishmaniasis en caninos de la ciudad de Neiva.
- Determinar la concentración de ADN en las muestras procesadas en el laboratorio de biología moléculas de la Corporación Universitaria del Huila CORHUILA

3. MARCO TEÓRICO

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria grave relacionada con la pobreza que supone una carga sanitaria cada vez mayor, causada por el protozoo parásito del género *Leishmania*, del que más de 20 especies son patógenas para humanos. Imagen 1. Esta enfermedad puede presentar diferentes manifestaciones clínicas que se clasifican en tres grandes grupos: leishmaniasis visceral (LV), leishmaniasis cutánea (LC) y leishmaniasismucocutánea (LMC); según la célula diana de replicación de los parásitos, que serían las células del sistema fagocítico mononuclear, de la dermis y las de los tejidos nasofaríngeos, respectivamente. (López, A. 2013) Imagen 2.



Imagen 1. Población susceptible a la *Leishmania* (Tomado de enfermedadesolvidadas.org/leishmaniasis-cutanea/ 2017)

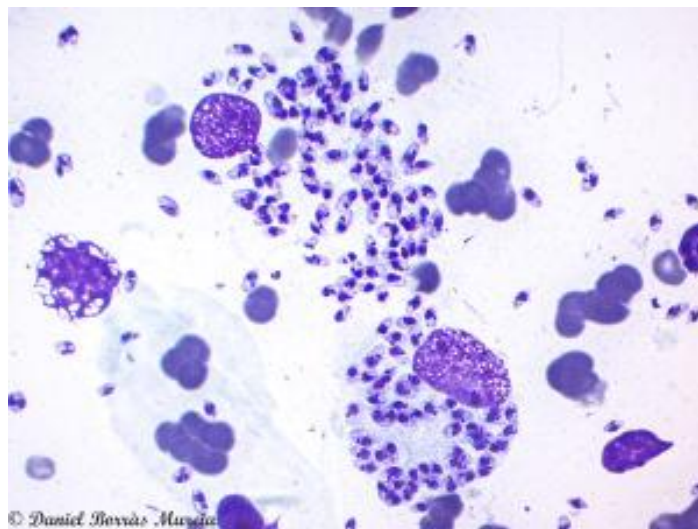


Imagen 2. Agente infeccioso de Leishmania (Navarro, Sánchez, Peñafiel-Verdú, Buendía, Altimira, Vilafranca 2010)

Esta parasitosis es muy cosmopolita, presentando una amplia distribución en todos los continentes excepto en la Antártida. La enfermedad ha sido reportada en 98 países y se han descrito casos de leishmaniasis cutáneas, mucocutáneas y viscerales (WHO, 2010). La OMS estima que hay unas 12 millones de personas infectadas en el mundo y que 350 millones están en riesgo de contraer la enfermedad produciéndose cada año dos millones de nuevas infecciones (0,5 millón de leishmaniasis visceral y 1,5 millón de leishmaniasis cutánea). Sin embargo, la mayoría de los casos no están reportados, siendo obligatoria la denuncia de los datos registrados sólo en 33 países. Debido a los daños económicos, sociales y psicológicos causados por la leishmaniasis, se considera un problema de alto impacto o estigmatización en la salud pública y, sin embargo, sigue siendo una de las enfermedades más olvidadas en el mundo. (López, A. 2013)

Debido a la variedad de signos clínicos presentes en la leishmaniasis visceral canina que en los casos sintomáticos incluyen letargo, pérdida de peso, disminución del apetito, anemia, esplenomegalia y linfadenopatía local o generalizada. La fiebre puede ser intermitente y en muchos casos estar ausente. Los trastornos de sangrado que se observan pueden ser epistaxis, hematuria y también melena. En algunos casos, el único signo que se presenta es epistaxis profusa. La enfermedad

renal crónica es común en los perros infectados con *L. infantum*; puede ser el único síndrome y es con frecuencia la causa de muerte (Couto 2010) el diagnóstico es complejo e impreciso, motivo por el cual se han desarrollado variados procedimientos para facilitar esta tarea. Es esencial el conocimiento de las bases de cada prueba, sus limitaciones y su interpretación clínica, teniendo en cuenta además que se recomienda el uso de más de una prueba diagnóstica (Troncarelli et al. 2009, Palatnik et al. 2001). El diagnóstico definitivo algunas veces depende del aislamiento del parásito en medios de cultivo o por la detección del DNA parasitario por la técnica PCR a partir de biopsias de médula ósea o nódulos linfáticos. Sin embargo estas técnicas son invasivas, costosas y requieren mucho tiempo para su desarrollo (Lachaud et al. 2001, Mettler et al. 2005).

También es susceptible el hombre especialmente los niños de corta edad y en ellos se produce una alta tasa de mortalidad en las áreas endémicas, por lo que representa un serio problema para la Salud Pública. Los caninos domésticos constituyen un importante reservorio de esta enfermedad. (Gómez et al. 2011).

Existen unos 40 casos referenciados desde principios del Siglo XX, y su incidencia parece haber aumentado en los últimos años, especialmente en el sur de Europa, donde es un hecho que la leishmaniosis, causada por *L. infantum*, es una zoonosis endémica que afecta principalmente a la especie canina y que independientemente de que el perro y el zorro sean los principales reservorios de aquella, otras especies como la felina (hasta ahora considerada hospedador accidental) están ganando terreno en este aspecto, en la imagen 3 nos muestra el ciclo de vida de la leishmania (Solano, 2007 y Mancianti, 2004). Así lo intentan demostrar estudios experimentales realizados por Simoes Mattos et al. y Maroli et al. donde se prueba la susceptibilidad del gato a la infección por *Leishmania* y la capacidad infectiva de en esta especie, por tanto, su posible papel como reservorio de la enfermedad. Pero, aunque sea una patología poco común en esta especie, no sucede lo mismo con la prevalencia de la infección en las áreas endémicas para leishmaniosis, donde se han diagnosticado casos de leishmaniosis. Así, en estudios epidemiológicos realizados en Italia y España utilizando por ejemplo la técnica PCR,

se obtienen resultados del 25 al 60% de positividad, en la población felina analizada por Pennisi et al. y Martín-Sánchez et al., respectivamente.

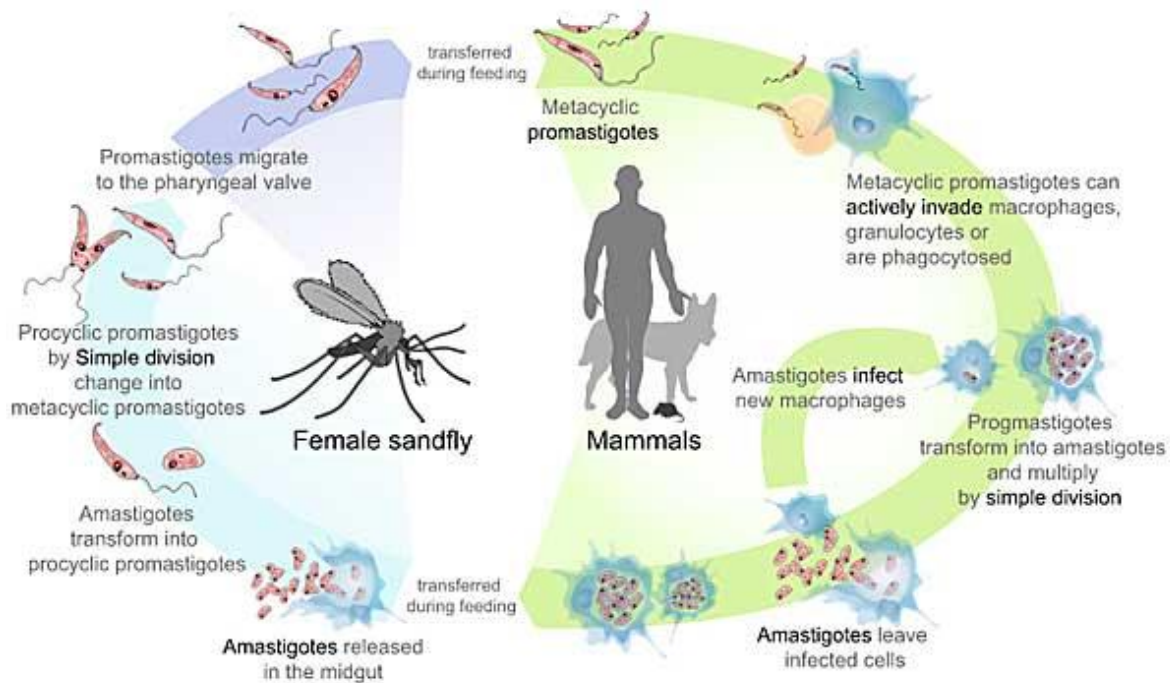


Imagen 3. Ciclo de la leishmania (Tomado de doogweb.es 2014)

Según Hervas, (2002) Cabe recalcar que un 73% de los casos publicados de leishmaniosis activa se daban en animales con inmunidad comprometida (infección con retrovirus, tratamientos inmunosupresores, neoplasias, etc.). En cuanto al cuadro clínico, los síntomas cutáneos son los que predominan en un 65% de los casos, (Pennisi, 2007) similares a los presentes en la leishmaniosis canina. Entre los más frecuentes están los nódulos y las úlceras, principalmente en la cabeza y cuello, aunque se han descrito nódulos hemorrágicos que nunca se han dado en el perro. (Pennisi, 2002). Los síntomas sistémicos son inespecíficos y entre ellos podemos encontrar linfadenomegalia, esplenomegalia, anorexia, adelgazamiento, etc.

Para realizar el diagnóstico se han empleado diferentes técnicas, tanto directas (citología, histopatología, PCR y aislamiento) como indirectas (IFI, WB, ELISA, HAI, TAD) considerándose necesario la utilización de las primeras para obtener un diagnóstico definitivo y a la PCR como una de las técnicas más sensibles para el diagnóstico en esta especie, (Pennisi, 2000 y 2007, Martin, 2007) ya que no existe una buena estandarización para la valoración de los resultados en cuanto a los métodos serológicos indirectos; además, se puede apreciar la diferencia de resultados en los estudios epidemiológicos que utilizan estas técnicas (Pennisi, 2000 y 2007, Martin, 2007) y también la falta de correlación entre los resultados serológicos y la sintomatología clínica (Simoes, 2005). En los últimos años se ha reiterado la importancia que tienen las herramientas de biología molecular en el diagnóstico confirmativo de la infección por *Leishmania*, ya que son técnicas que se caracterizan por su alta sensibilidad y especificidad, así como por la posibilidad de detección de la presencia del parásito en etapas tempranas de infección (Lachaud, Chabbert et al., 2002; Lachaud, Marchergui-Hammami et al., 2002; Passantino, 2006; Reithinger&Dujardin, 2007).

El uso conjunto de la Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR) y las pruebas serológicas, pueden ayudar a determinar la extensión de la infecciones subclínicas y permiten estimar el número de caninos objeto del programa de control. Mientras que el diagnóstico por PCR para la LV en humanos puede ser considerado como eficiente, el diagnóstico de la enfermedad en caninos, sigue presentando inconvenientes, debido por ejemplo, al desconocimiento del tejido que ofrezca más información para ser muestreado, las dificultades encontradas en la preparación del DNA o la alta frecuencia de inhibidores del PCR en presencia de la sangre canina (Lachaud et al. 2001).

El PCR basado en médula ósea, nódulos linfáticos y muestras de piel, han sido las muestras diagnósticas con mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la LVC (Quaresma et al. 2009). Sin embargo, se recomienda el uso de sangre periférica, porque su obtención requiere de técnicas poco invasivas,

produciendo bajo estrés en los animales, facilita su reproducibilidad y su efectividad ha sido demostrada en el diagnóstico molecular en población humana. Su uso en caninos se recomienda porque se ha demostrado la circulación del parásito en sangre periférica (Quaresma et al. 2009 y Solano et al. 2001).

En estudios realizados por Montalvo et al (2008) encontró que la proteína HSP20 recombinante es reconocida por anticuerpos en el suero de personas con leishmaniosis visceral, y de forma más eficiente en el suero de perros con leishmaniosis canina, lo que demuestra su importancia biológica y su posible utilidad en el diagnóstico. Las técnicas moleculares han demostrado ser técnicas más sensibles que otros métodos parasitológicos como citologías teñidas o el cultivo del parásito (Lachaud et al. 2001 y Manna et al. 2009); aunque otros autores indican, que el uso de médula ósea como muestra para el desarrollo de PCR no es apropiado, por los bajos valores de sensibilidad obtenidos (Solano et al. 2001). Estudios observacionales prospectivos han demostrado que existe una asociación positiva entre la presencia de signos clínicos de LVC y los resultados positivos por PCR, estando relacionados con las formas clínicas severas (Manna et al. 2009).

Métodos directos: el procedimiento de elección en el perro es la biopsia por aspiración del tejido procedente del ganglio o médula ósea. La punción ganglionar se realiza sobre todo en poplíteos o preescapulares, en los que, por aspiración con aguja gruesa, se recoge tejido ganglionar que se extiende sobre un porta y que luego se tiñe con Giemsa, La punción medular se realiza en la cara interna del fémur, la cresta ilíaca o la unión costoesternal y dada la elevada concentración de parásitos en este tejido, se considera un método más sensible. También se puede realizar biopsias, para obtener improntas o cortes histológicos donde investigar la presencia del parásito, así como realizar frotis con el material subyacente de úlceras, obtenido con una aguja gruesa (Cordero. M. Rojo. F, 1999)

4. METODOLOGÍA

4.1 Tipo de estudio:

- El tipo de estudio es aplicado y observacional analítico
- El estudio descriptivo de corte transversal cuantitativo en donde se incluirán a los caninos., a quienes se les realizará el diagnostico mediante la técnica de PCR.

4.2 Población:

La Población seleccionada fue de 150 muestras de sangre de caninos de diferentes clínicas veterinarias del municipio de Neiva.

4.3 Tamaño de la muestra

Se seleccionaron 150 muestras de diferentes clínicas veterinarias escogidas al azar de diferentes perros que llevaban a consulta médica sin importar su remisión.

4.4 Fases o momentos de la investigación

Extracción de DNA: El DNA de las muestra de sangre fue extraído, implementado el Kit comercial QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Para la extracción de DNA, se emplearán muestras de sangre completas, un volumen de 200ul. El DNA extraído será cuantificado con el fluorometria.

PCR: Se utilizara la PCR para amplificar los genes de interés. En primer lugar el gen que codifica la Hsp70, constituye el blanco del análisis (García et al., 2004).

4.5 Equipos y Materiales

Los equipos y materiales se describen a continuación y sus usos durante el desarrollo de la investigación.

4.6 Equipos:



Imagen 4. Cabina de flujo laminar (Foto: Ramos 2019)

- **Cabina de flujo laminar.** Equipo que funciona emitiendo un flujo de aire a través de un filtro HEPA (High EfficiencyParticulateAbsorbing), hacia la interior de la cabina para crear un ambiente libre de la contaminación.



Imagen 5. Vortex (foto Autores)

- **Mezclador de tubos o agitador vortex.** Equipo usado para agitar tubos o frascos de líquido y así homogenizar la muestra.



Imagen 6. Microcentrifuga (Foto Ramos 2019)

- **Microcentrífuga.** Equipo usado para rotar muestras de laboratorio almacenadas en tubos, y así separa sus componentes, con ella se realizaron los diferentes lavados para la extracción del ADN de las muestras.



Imagen 7. Termobloque (Foto: Ramos 2019)

- **Termobloque.** Utilizado para estabilización de las muestras en cuanto a temperatura, este equipo no se llegó a utilizar en su momento, lo cual fue reemplazado por un baño María para el manejo de la temperatura de las muestras durante el desarrollo del trabajo.



Imagen 8. Micropipetas (Foto: Ramos 2019)

- **Micropipetas de volúmenes 0.1–1, 1-20, 20-200 y 200-1000 μ l.** Usadas para absorber y transferir volúmenes de líquidos que se requieren para los diferentes procedimientos que tienen los protocolos.



Imagen 9. Purificador de Agua (Foto Ramos 2019)

- **Fluorometro;** es un equipo de laboratorio que se usa para medir los parámetros de la fluorescencia de una muestra, midiendo la intensidad y la distribución de longitudes de onda del espectro de emisión después de la excitación por un cierto espectro de luz (Hernández et al 2002)



Imagen 1. Fluorómetro (Foto Autores)

El fluorómetro Qubit usa tintes fluorescentes para determinar la concentración de ácidos nucleicos y proteínas en una muestra. Cada tinte es específico para un tipo de molécula: ADN, ARN o proteína. Estos tintes tienen una fluorescencia extremadamente baja hasta que se unen a sus objetivos (ADN, ARN o proteína). Al unirse, se vuelven intensamente fluorescentes (Kumar et al., 2016).

- **Purificador de agua:** en el laboratorio se requiere para usar agua ultra pura que no tenga minerales ni otros agentes que puedan interferir con la extracción de and específico así de evita la contaminación.



Imagen 10. Termociclador (Foto: autor)

- **Termociclador** es el equipo que realiza ciclos de temperaturas necesarios para la amplificación de diversas hebras de ADN en la técnica de la **PCR**. Manejando temperaturas entre 4 °C a 96 °C donde mantiene por ciclos estables en el ocurre la desnaturalización, hibridación y extensión de una molécula de ADN.

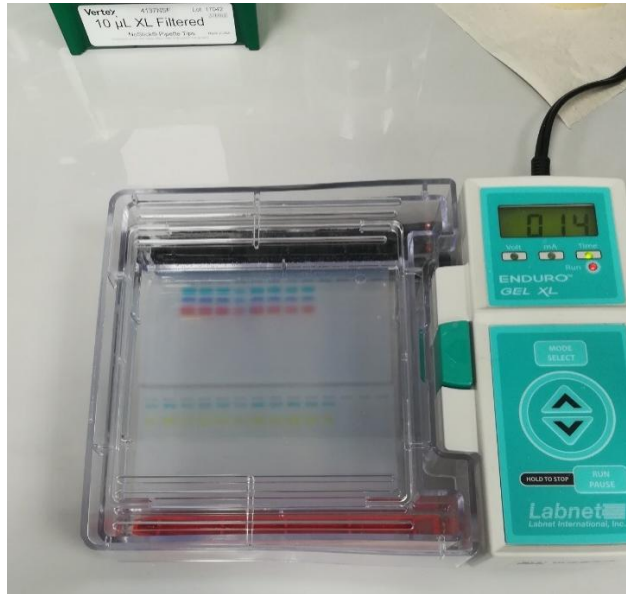


Imagen 11. Electroforesis (Foto: autor)

- **Electroforesis:** equipo usado para emitir cargas eléctricas a través de un gel de agarosa para observar el paso del ADN por los poros.

4.7 Materiales



Imagen 12. Foto del kit de leishmania (Foto: autor)

Imagen 9. Kits PCR usados para extracción de ADN (Foto Ramos 2019)

- Puntas de Micropipetas de 0.1–1, 1-10, 20-200 y 100-1000 µl.
- Tubos *ependorf* de 1.5 ml, grado biología molecular.

5. EXTRACCIÓN DE ADN EN SANGRE CON EL KIT QIAAMP DNA MINI AND BLOOD.

Recomendaciones antes de iniciar el proceso que de extracción dados por la casa matriz.

- Equilibrar las muestras a temperatura ambiente (15-25 ° C).
- Calentar el termo bloque (baño María) a 56 ° C para usarlo en el paso 4.
- Equilibrar el Tampón AE o el agua destilada a temperatura ambiente para la elución en el paso 11.
- Asegúrese de que se han preparado los tampones AW1, Buffer AW2 y QIAGEN Proteinasa K, según instrucciones de la página 16.
- Si se ha formado un precipitado en buffer AL, disuelva incubando a 56 ° C.
- Marcar los tubos de acuerdo a la muestra de sangre

5.1 Procedimiento

1. Pipetear 20 µl de QIAGEN proteinasa K en el fondo de un tubo de 1,5 ml
2. Añadir 200 µl de muestra al tubo. (Sangre entera, plasma, suero, cepa leucocitaria o fluidos corporales)

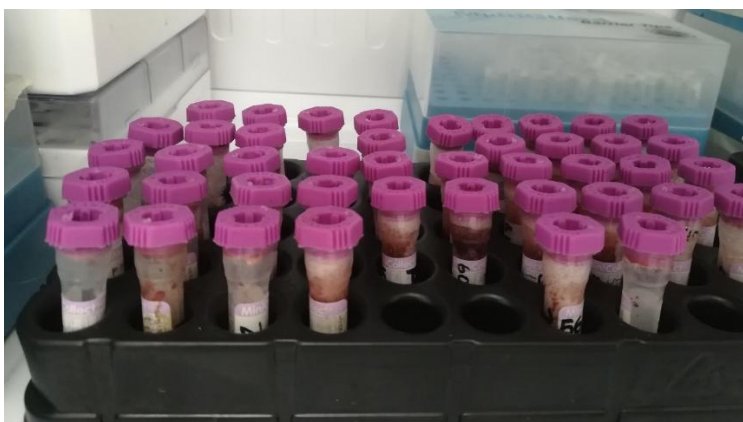


Imagen 13. Muestras de sangre colectadas de diferentes clínicas (Foto: autor)

3. Adicionar 200 μ de Buffer AL a la muestra y poner en el vortex durante 15 segundos

Para garantizar una lisis eficaz, es esencial que la muestra y el Buffer AL se mezclen para dar una solución homogénea.

Si el volumen de muestra es mayor de 200 μ l, aumente la cantidad de QIAGEN Proteasa (o proteinasa K) y Buffer AL proporcionalmente; Por ejemplo, 400 μ l de la muestra requerirá 40 μ l de QIAGEN Proteasa (o proteinasa K) y 400 μ l de Buffer AL. Si se requieren volúmenes de muestra mayores de 400 μ l, el uso de QIAamp DNA Blood, se recomienda el kit Midi o Maxi; estos pueden procesar hasta 2 ml o hasta 10 ml de la muestra, respectivamente.

Nota: No añada QIAGEN proteinasa K directamente al Buffer AL.

4. Incubar a 56°C durante 10 minutos

5. Centrifugar brevemente en el tubo de 1,5 ml para eliminar las gotas del interior de la tapa

6. Adicionar 200 μ l de etanol (96-100%) y mezclar nuevamente en el vortex durante 15 segundos. Después de mezclar, centrifugar brevemente para que no quede la mezcla en la tapa.

Si el volumen de la muestra es mayor de 200 μ l, aumente la cantidad de etanol proporcionalmente; Por ejemplo, una muestra de 400 μ l requerirá 400 μ l de etanol.

7. Aplicar cuidadosamente la mezcla de la etapa 6 a un tubo QIAamp Mini (en un recipiente de 2 ml Tubo de recogida) sin humedecer el borde del tubo. Cerrar la tapa y centrifugar a 8000 rpm durante 1 min.

Colocar la columna de centrifugado QIAamp Mini en un tubo limpio de 2 ml (Proporcionado), y desechar el tubo que contiene el filtrado.

Si la solución no ha pasado completamente a través de la columna después de la centrifugación, centrifugar nuevamente a mayor velocidad hasta que la columna de centrifugado QIAamp Mini esté vacía.

8. Abrir con cuidado el tubo con la columna de QIAamp Mini y agregar 500 µl del buffer AW1 sin mojar el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a 8000 rpm durante 1 min. Coloque la columna de centrifugado QIAamp Mini en un tubo de recogida limpio de 2 ml y desechar el tubo de recogida que contiene el filtrado.

9. Cuidadosamente abrir el tubo QIAamp Mini y adicionar 500 µl del buffer AW2 sin mojar el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a 14000 rpm durante 3 min.

10. Se recomienda tomar un nuevo tubo con columna de 2 ml y descartar el filtrado anterior, y centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.

Este paso ayuda a eliminar la posibilidad de encontrar buffer AW2.

11. Colocar la columna de centrifugación QIAamp Mini en un tubo limpio de 1,5 ml de microcentrífuga (no Suministrados), y descartar la colección de tubos que contiene el filtro. Abrir cuidadosamente el tubo QIAamp Mini spin column y añadir 200 µl del Buffer AE o agua destilada.

Dejar a temperatura ambiente (15-25 ° C) durante 1 minuto, y luego centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.

Dejar el tubo QIAamp Mini spin con el buffer AE o el agua destilada durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de la centrifugación generalmente incrementa el rendimiento del ADN.

Un segundo lavado con 200µl de búfer AE aumentará los rendimientos por encima del 15%. Los volúmenes de más de 200 µl no se deben diluir en tubos 1,5 ml porque la solución al momento de la centrifugación se puede salir del tubo.

La elución con volúmenes de menos de 200 µl aumenta la concentración final de ADN significativamente, pero reduce ligeramente el rendimiento total de ADN Para las muestras que contienen menos de 1 µg de ADN, elución en 50 µl de Tampón.

Se recomienda AE o agua. La elución con 2 x 100 µl en lugar de 1 x 200 µl hace que no incremente la eficacia de la elución.

Se recomienda almacenar el ADN entre -30 a -15 ° C, ya que el ADN almacenado en el agua está sujeto a hidrólisis ácida.

En la siguiente es una demostración del procedimiento de extracción de ADN.



Imagen 14. Extracción de ADN (Foto: Autor)

6. CUANTIFICACIÓN DE ADN DE LAS MUESTRAS

Se preparó la solución de trabajo en un tubo aparte de la siguiente forma:

- Aplicar 200 μL de buffer de trabajo para cada una de las muestras.
 - Usar 1 μL de Qubit3 DNA quantificationsolution y 199 μL de solución de trabajo por muestra para preparar el buffer de trabajo.
 - Mezclar con vortex
- a) Alicuotar 180 μL – 199 μL fuera de la solución de trabajo en los tubos de ensayo para las muestras.
- b) Colocar en cada tubo 1 – 10 μL de muestra según su elección y asegurarse de que cada vial quedó con un volumen final de 200 μL ; si no es así, completar con buffer de trabajo.



Imagen 15. Proceso de cuantificación (Foto: Ramos 2017)

3. Se etiqueto un tubo para cada muestra y uno para cada estándar, se tomaron 199 μ L del stock para cada muestra en un tubo nuevo y agregarle 1 μ L de muestra, homogeneizar envortex.

4. el procedimiento sobre el equipo de cuantificación fue: en el primer menú de opciones que el equipo muestra es el menú de ensayos, si se trata de cuantificar ADN para librerías presionar sobre la pantalla ADN de doble cadena (dsDNA, doublestrand DNA) y luego High sensitivity y después readstandards.

5. Se calibro el equipo para ello se lee la mezcla de los estándares (tubo rojo estándar 1, tubo amarillo estándar 2) con la solución de trabajo, estos se preparan mezclando 190 μ L del stock con 10 μ L de cada estándar (homogeneizar cada estándar en vortex y darle un espín ligero antes de hacer la mezcla), homogeneizar e incubar dos minutos antes de leer.

El equipo pide leer primero el estándar 1 de este solo graficará los dos primeros valores de la curva, después se lee el 2 del cual grafica los últimos tres puntos, los valores de lasmuestras deben estar en el rango de los valores de la curva de calibración; se coloca el tubo del estándar la cavidad de la parte superior, se cierra la cubierta y se presiona en leerestándar (Palomino, 2017).



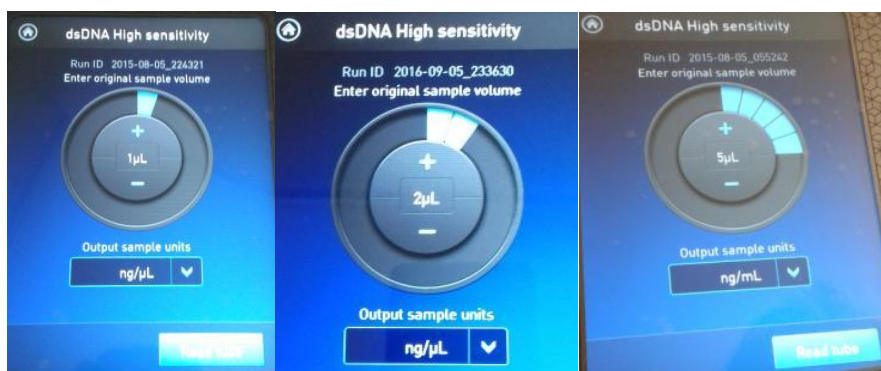
Imágenes 16. Proceso de lectura punto inicial (Foto: Palomino, 2018)

7. El equipo considera los dos primeros valores leídos del estándar 1 para la curva de calibración y los últimos 3 del estándar 2, una vez leídos los estándares el equipo mostrará una gráfica con los valores obtenidos y dará la opción de leer las muestras.

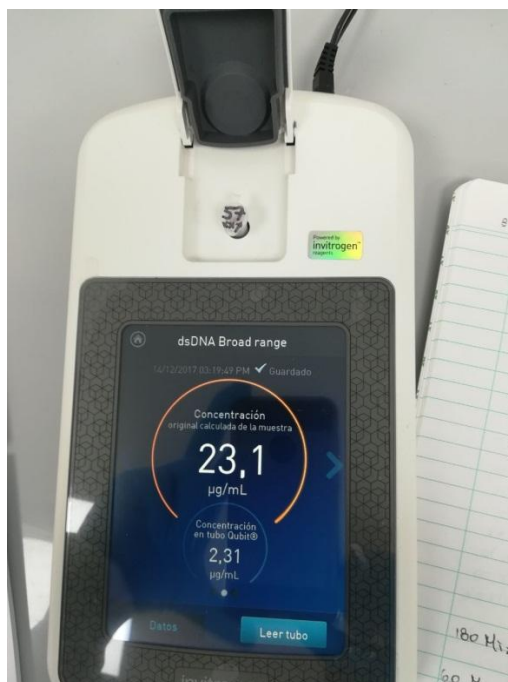


Image 17. Proceso de calibracion de grafica (Foto: Palomino, 2018).

8. Al terminar de leer los estándares se prepara la mezcla de solución de trabajo (stock) con la muestra agregando **2 µL** de esta a 198 µL de solución del stock se incuba 2 minutos después de la homogenización en vortex y se debe leer inmediatamente, si pasa mucho tiempo habrá un sesgo en los valores leídos, usualmente se usa **1 µL** pero se recomiendan **2 µL**, en este caso ajustar el Qubit para que lea las muestras a **2 µL**, se puede ajustar a 5 µL o más dependiendo del experimento, para ADN suelen ser suficientes 2.



Imágenes 18. Ajuste de calibracion según concentracion de la muestra (Foto: Palomino, 2018)



Imágenes 19. Lecturas de concentración de ADN (Foto: Autor)

9. El valor final se aparece dentro del círculo al terminar la lectura de la muestra, estos datos pueden exportarse desde un puerto USB en la parte trasera del equipo, o bien el equipo puede conectarse a una computadora para exportar los datos presionando en la opción Data.

10. Se recomienda dar un vortex a los tubos antes de leerlos e incubarlos dos minutos, también es importante leer los tubos dos veces, primero todos una vez y luego todos de nuevo, más no leer un mismo tubo dos veces seguidas.



Imágenes 20. Lecturas de concentración de ADN (Foto: Palomino, 2018)

11. El equipo muestra dos valores uno en un círculo grande que considera el factor de dilución y el del círculo pequeño indica la concentración sin considerar el factor de dilución, para reportar el valor si se siguió el protocolo el valor del círculo grande es el real, si se hizo algún ajuste de volumen de muestra (el equipo permite un rango de 1 – 10 μL de muestra) en el ejemplo de abajo el valor de 15.4 se multiplica por el volumen total (200 μL) y se divide entre 1000 esto da como resultado el valor del círculo grande, si hubo algún ajuste de volumen se deben hacer los cálculos de factor de dilución para corregir los valores. Se recomienda leer los tubos inmediatamente ya que el colorante tiende a degradarse con la luz y después de un tiempo si la muestra se vuelve a leer el equipo arroja resultados distintos y sesgados, a veces arriba del valor original leído y a veces debajo.

Imagen 21. Lecturas de ADN (Foto: Palomino, 2018)

En la siguiente imagen nos muestra los diferentes materiales y equipos usados durante la cuantificación de ADN en cada una de las muestras

Imagen 22. Materiales usados durante la cuantificación (Foto: Autor)

Una vez cuantificadas las muestras son destinados para el proceso de PCR

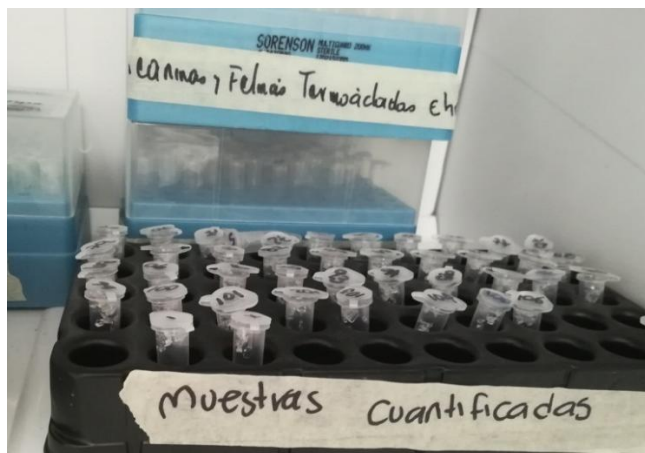


Imagen 24. Muestras ya cuantificadas

7. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR

Para el proceso de termociclador de las muestras se realizó el siguiente método:

- Preparación de los diferentes controles (control positivo, control negativo, control interno).
- Adición de aceite mineral para evitar la evaporación de las muestras durante el proceso.
- En la siguiente tabla nos muestra las cantidades de componente y sus volúmenes a cada muestra para ser posteriormente termocicladas.

Tabla 1. Componentes de la reacción para PCR

Kit components	Sample	Positive control	Negative control	Internal control
VetPCR™ LEISHMANIA Premixture	5.5µL	5.5µL	5.5µL	
PCR Internal control (white cap)				5.5µL
DNase/RNase free water	6µl	6µl	6µl	6µl
DNA isolated from the sample	2µl			2µl
LEISHMANIA PCR Positive control		2µl		
PCR Negative control			2µl	
Mineral Oil Solution	11µl	11µl	11µl	11µl

En la siguiente tabla 2. Nos muestra la programación que debe tener el termociclador para realizar los diferentes ciclos, temperaturas y tiempo en cada ciclo.

Tabla 2. Parámetros de ciclos para PCR

PCR cycle		Temp	Time
1 cycle	Initial Denaturation	94°C	2 min.
30 cycles	Denaturation	94°C	30 sec.
	Annealing	55°C	30 sec.
	Extension	72°C	30 sec.
1 cycle	Final extension	72°C	5 min.

En la siguiente imagen 25 se encuentran las diferentes muestras ya termocicladas las cuales incluyen los diferentes controles para su comparación.



Imagen 25. Muestras procesadas en el termociclador (Fotos Autor)

8. PREPARACIÓN DE GEL DE AGAROSA PARA ELECTROFORESIS

Para la preparación de un gel de agarosa se precisan 4 cosas:

1. La agarosa en polvo.

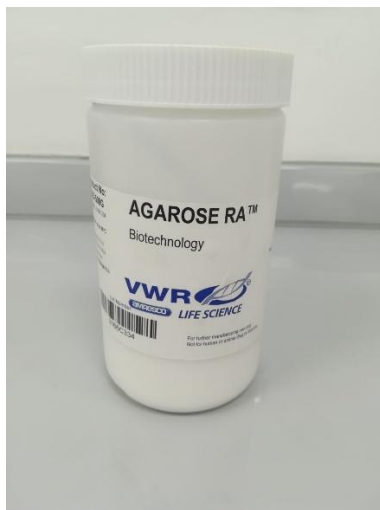


Imagen 26. Tarro de agarosa (Foto Autor)

2. Tampón en el que se disuelve la agarosa y que sirve para embeber el gel y transmitir el campo eléctrico.



Imagen 27. Solución buffer para preparar el gel. (Foto Autor)

3. Fuente de calor o microondas para mezclar y fundir la agarosa en el tampón.



Imagen 28. Microondas para calentar y diluir la agarosa en el buffer (Foto Autor)

4. Cubeta y molde para solidificar el gel y sumergirlo en el tampón. La cubeta tiene los bornes para conectar los cables a la fuente de alimentación.

En un matraz, verter la cantidad de tampón para completar el volumen del molde a rellenar con el gel.

Medir la cantidad de agarosa dependiendo de la concentración a la que se quiera obtener el gel. A más concentración, mayor resolución. Por ejemplo, un gel al 2% sería 2 gramos de agarosa en polvo disueltos en 100 ml de tampón. Como podéis comprobar, la concentración se obtiene mediante la relación peso/volumen. Sencillo.

Se procede a mezclar la agarosa con el tampón y fusionar los componentes para obtener el gel. Se necesita una fuente de calor como un baño (poco recomendable si se quiere rapidez) a una temperatura que permita fundir la agarosa o un microondas, que permite realizar el proceso más rápidamente. Con la experiencia,

es todo un arte dependiendo de las concentraciones y las agarosas. Pero esto es sólo a modo introductorio.

Se enfría el gel para poder verterlo en la cubeta. Siempre hay que acordarse de poner unos límites con cinta para que no se disperse el gel por la mesa y el peine que formará los pocillos. En unos minutos, al enfriarse del todo, se tiene el gel polimerizado.

Por último se introduce en la cubeta que contiene el tampón, a la misma concentración que el que se ha utilizado para generar el gel.

Seguido queda cargar las muestras y correr el gel al voltaje predeterminado (generalmente a 10 voltios por cm de gel, pero depende de las muestras, el gel y los protocolos a seguir). Luego se deberá realizar una tinción para poder ver las bandas. Existen varios métodos para la preparación de gel de agarosa para electroforesis y serán limitantes para el posterior visionado, pero eso lo comentaré en otro artículo.

El gel final se puede fotografiar y guardar la imagen. Incluso se pueden extraer bandas de interés para un posterior análisis, como podéis ver en la imagen que he tomado estos días donde estuve cortando unas banditas.

9. ELECTROFORESIS EN GEL

Esta técnica hace que el ADN se fragmente por su tamaño y carga. La electroforesis aplica una carga eléctrica a través de un gel que contiene diferentes moléculas. Con base en su tamaño y carga, las moléculas se desplazarán por el gel en diferentes direcciones o a distintas velocidades, con lo que se separan unas de otras.

La electroforesis nos deja ver las partes del ADN que se fragmenta ubicándose en diferentes posos según su tamaño y comparándolo junto a una "escala" estándar de fragmentos de tamaño conocido. La electroforesis en gel actúa sobre material similar a la gelatina, estos separan el ADN suelen estar hechos de un polisacárido llamado agarosa. A nivel molecular, el gel es una matriz de moléculas de agarosa que se mantienen unidas por puentes de hidrógeno y que forman pequeños poros. En un extremo, el gel tiene muescas en forma de ranuras llamadas pozos, que son donde se colocarán las muestras de ADN como lo muestra la imagen 29.

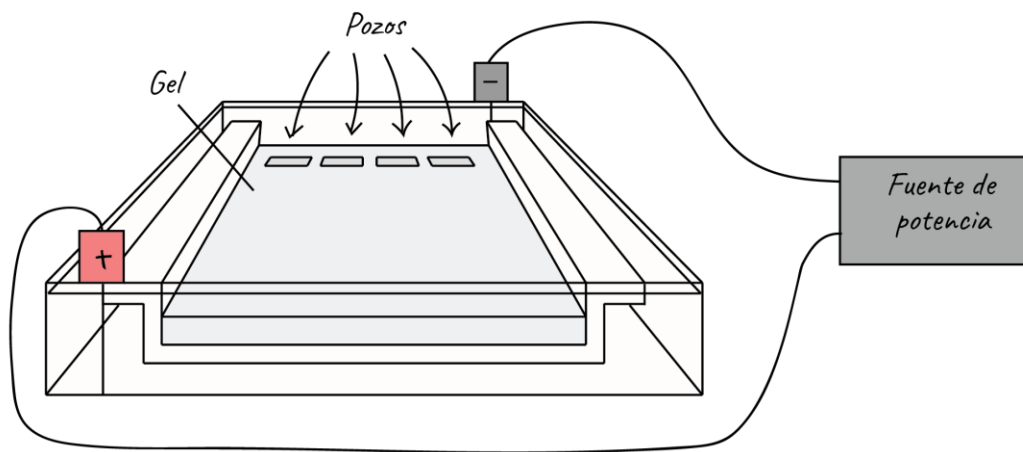


Imagen 29. Equipo de electroforesis con el gel y sus pozos. (Reece et al. 2002)

El extremo del gel que tiene los pozos se coloca hacia el electrodo negativo. El extremo sin pozos (hacia donde migrarán los fragmentos de ADN) se coloca hacia el electrodo positivo con cada una de las muestras en los pozos respectivos, posteriormente se aplica energía eléctrica a la cámara y empieza a fluir corriente a

través del gel, Los grupos fosfato de su esqueleto de azúcares-fosfato le otorgan una carga negativa a las moléculas de ADN, por lo que comienzan a moverse a través de la matriz de gel hacia el polo positivo. Cuando el sistema está encendido y pasa corriente por el gel, se dice que el gel está corriendo (Reece et al.2002)

Para poder visualizar las bandas en el gel se deben impregnar las muestras con un marcador que cuando en el momento que sea aplicado un rayo de luz UV los fragmentos brillen en el gel, como lo muestra la imagen 30

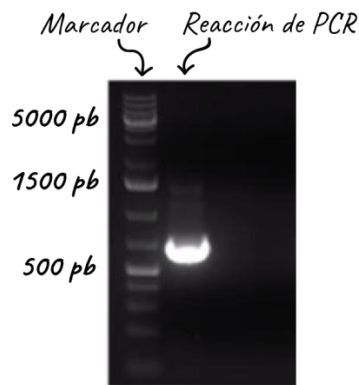


Imagen 30. Brillo que ejerce una muestra sobre un marcador

Para poder llegar a un diagnostico las bandas que marcan se deben comparar con un marcador el cual nos indica el peso y tamaño de la muestra en la imagen anterior nos muestra un aproximado de 700 pares de bases (pb).

En la siguiente imagen 31.lecturas de bandas proteicas de muestras analizadas por PCR y corridas en Electroforesis en gel de agarosa.

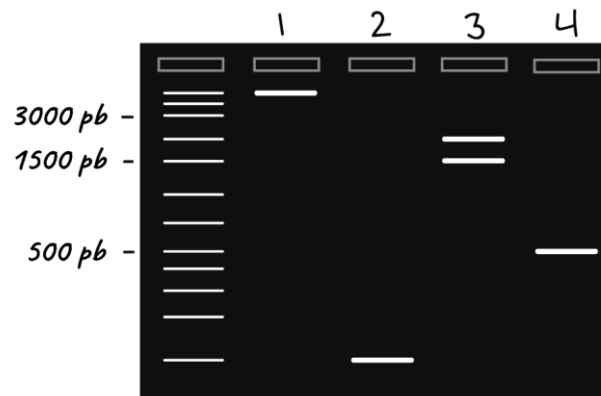


Imagen 31. Análisis de electroforesis

Carril de extrema izquierda: marcador de peso molecular con bandas de 3000 pb, 1500 pb y 500 pb marcadas sobre él.

Muestra 1: banda de 5000 pb.

Muestra 2: banda de 100 pb.

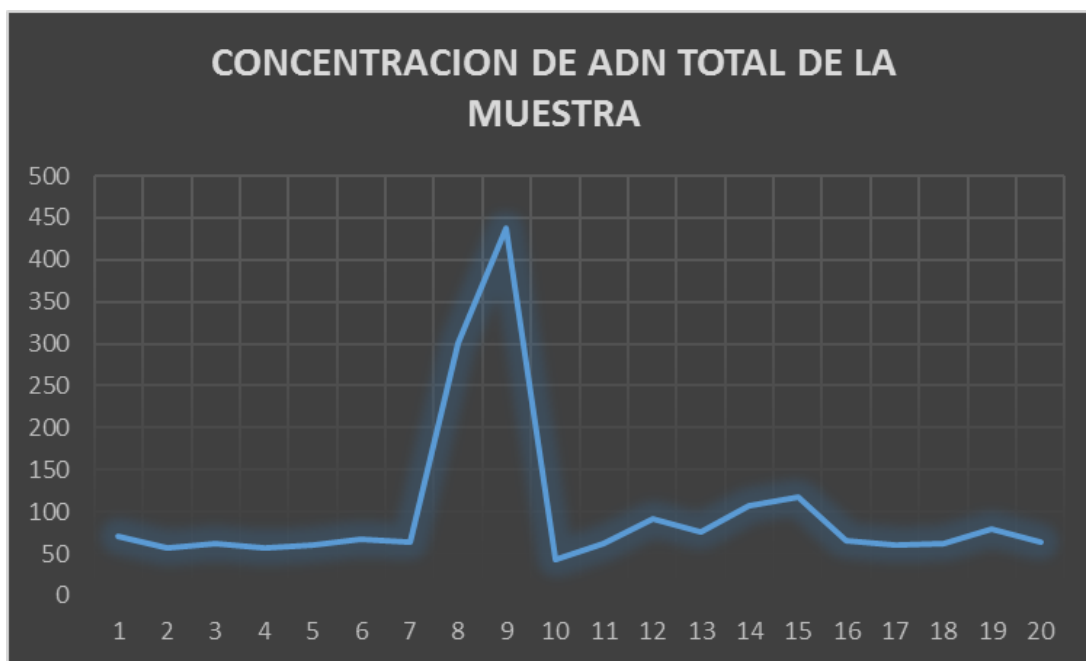
Muestra 3: bandas de 1500 pb y 2000 pb.

Muestra 4: banda de 500 pb.

En el gel anterior se numeran cuatro carriles. (Un carril es un corredor por el cual pasa el ADN al salir de un pozo). (Helmenstine, 2018)

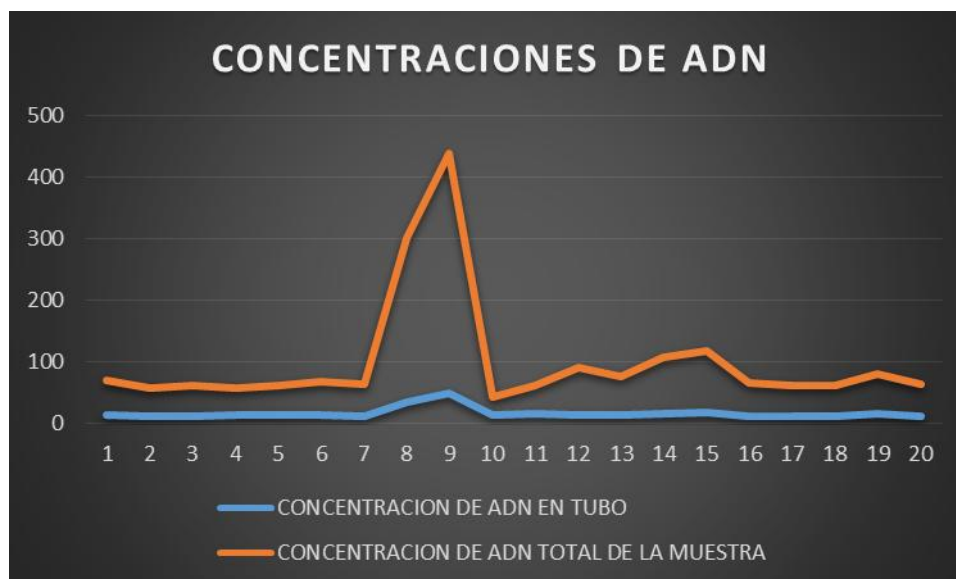
10.RESULTADOS

Resultados encontrados mediante la técnica de fluorometría nos muestra los siguientes parámetros, se evaluaron 20 muestras para analizar la concentración en tubo de la muestra a una dilución de 1% de la muestra original en 99 partes del diluyente, obteniendo la siguiente gráfica, donde se obtuvieron resultados con una alta concentración de ADN en dos de las muestras y un promedio de 100,41 como lo muestra la tabla 3.



Grafica 1. Concentraciones de ADN en 20 muestras eje X y su concentración eje Y en las muestras de sangre en los caninos de la ciudad de Neiva

Aplicando la fluorometría nos muestra los siguientes resultados, en la gráfica 2 se observa las concentraciones calculada de ADN por el equipo en el total de la muestra evaluada.



En la siguiente tabla se registran 20 resultados de fluorimetría escogidos al azar para evaluar la concentración total de ADN en la muestra.

CONCENTRACION DE ADN EN TUBOng/μL	CONCENTRACION DE ADN TOTAL DE LA MUESTRAng/μL
13,02	69,92
12,5	57,65
12,01	62,21
12,9	57,61
14,09	60,83
12,76	67,64
12,12	64,19
34,02	300,96
49,05	438,48
12,63	43,15
14,79	62,3
13,34	90,8
13,35	76,55
16,49	106,67
18,36	117,45
12,01	66,18
12,32	60,8
11,7	61,17
15,03	79,51
12,04	64,14

Tabla 3 de promedios encontrados en concentraciones de ADN

CONCENTRACION PROMEDIO DE ADN EN TUBO	CONCENTRACION PROMEDIO DE ADN TOTAL
16,22ng/μL	100,41ng/μL

Tabla 4. Resultados de cuantificación de ADN

CONCENTRACIONES DE ADN EN LAS MUESTRASng/μL									
Muestra	Valor	Muestra	Valor	Muestra	Valor	Muestra	Valor	Muestra	Valor
1	13,02	31	6,99	61	20,8	91	15,7	121	21,1
2	12,5	32	5,1	62	3,23	92	23,8	122	4,79
3	12,01	33	7,18	63	8,36	93	34,8	123	19,2
4	12,9	34	6,78	64	0,72	94	36,8	124	4,36
5	14,09	35	17,3	65	4,4	95	31,8	125	6,08
6	12,76	36	8,72	66	0,8	96	53,4	126	14,6
7	12,12	37	19,9	67	16,8	97	74,8	127	7,95
8	34,02	38	16,8	68	4,96	98	53	128	24
9	49,05	39	6,61	69	24	99	0,972	129	21,6
10	12,63	40	11,8	70	7,04	100	2,98	130	19,5
11	14,79	41	7,2	71	0,19	101	13,5	131	18,3
12	13,34	42	13,02	72	16,9	102	24,6	132	22
13	13,35	43	12,5	73	2,14	103	0,58	133	5,88
14	16,49	44	12,01	74	20,8	104	18,3	134	7,56
15	18,36	45	12,9	75	10,2	105	88,4	135	25,5
16	12,01	46	14,09	76	11,5	106	30,2	136	26,9
17	12,32	47	12,76	77	11,4	107	16,2	137	28,9
18	11,7	48	12,12	78	8,2	108	13,4	138	28,7
19	15,03	49	34,02	79	3,55	109	21,8	139	2,54
20	12,04	50	12,63	80	17	110	5,76	140	23,6
21	17,9	51	14,79	81	11,2	111	14,5	141	21,5
22	21,9	52	13,34	82	15,9	112	12	142	21
23	18,2	53	13,35	83	18,7	113	7,84	143	8,79
24	22	54	16,49	84	24	114	9,04	144	95
25	16	55	18,36	85	19	115	20	145	59
26	9,44	56	12,01	86	22	116	5,47	146	34,9
27	8,76	57	12,32	87	22,4	117	16,4	147	34,1
28	6,88	58	11,7	88	16,3	118	20	148	29,7
29	6,8	59	15,03	89	19,5	119	3,32	149	27,8
30	20,8	60	12,04	90	49,6	120	25,7	150	36,2

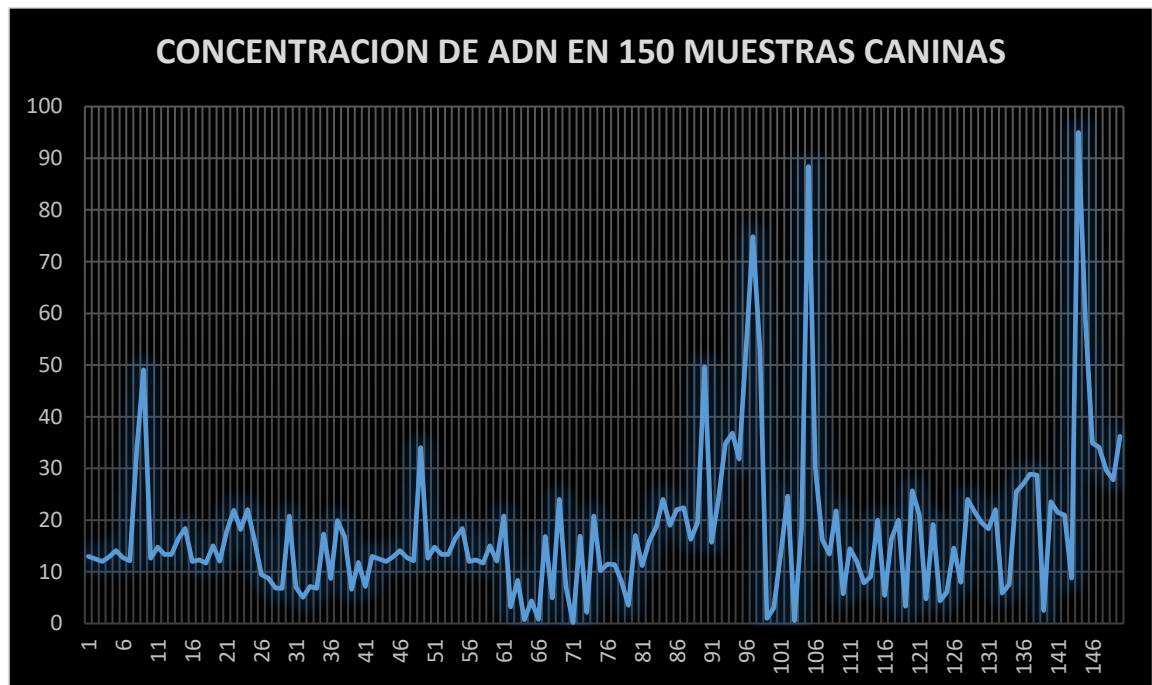
En la tabla anterior y la siguiente se muestran todos los resultados del análisis de fluorimetría encontrado en las 150 muestras de sangre canina.

En la siguiente tabla se describe el promedio encontrado de concentración de ADN en las muestras analizadas para caninos.

Tabla 5. Concentración promedio de ADN encontrado en las muestras de sangre.

CONCENTRACION PROMEDIO DE ADN EN TUBO EN LAS 150 MUESTRAS
17.80ng/μL

La siguiente grafica 3 muestra las concentraciones de las diferentes muestras usando el mismo protocolo de extracción para cada una de ellas.



Grafica 3. Diferentes concentraciones de ADN en las muestras analizadas por Fluorometría.

Finalmente después de termociclar las muestras se procedieron a realizar la electroforesis con el fin de detectar el marcador que indique su positividad para la Leishmania, como lo muestra la imagen 32.

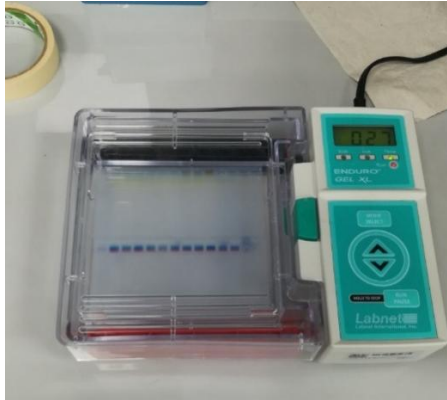


Imagen 32 Electroforesis de muestra de ADN termocicladas.

En la siguiente imagen nos muestra una prueba realizada resultado con negativo diciembre 2017.

Pozo 1: Control negativo

Pozo 2: Control positivo

Pozo 3: Muestra negativa Leishmania

Pozo 4: Muestra negativa Leishmania

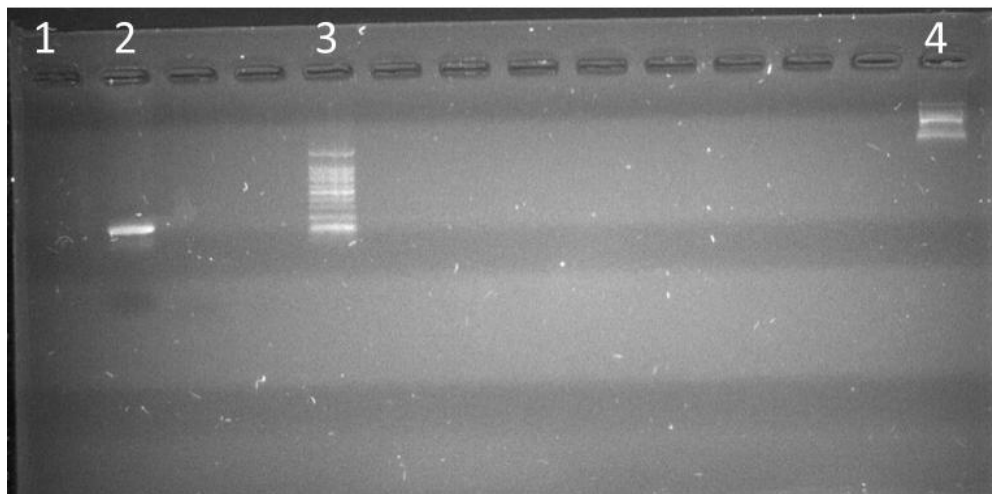


Imagen 33. Resultados de electroforesis en dos muestras

En la siguiente prueba de resultado se observó que la muestra 61 resulto negativa a la presencia de ADN de Leishmania canina

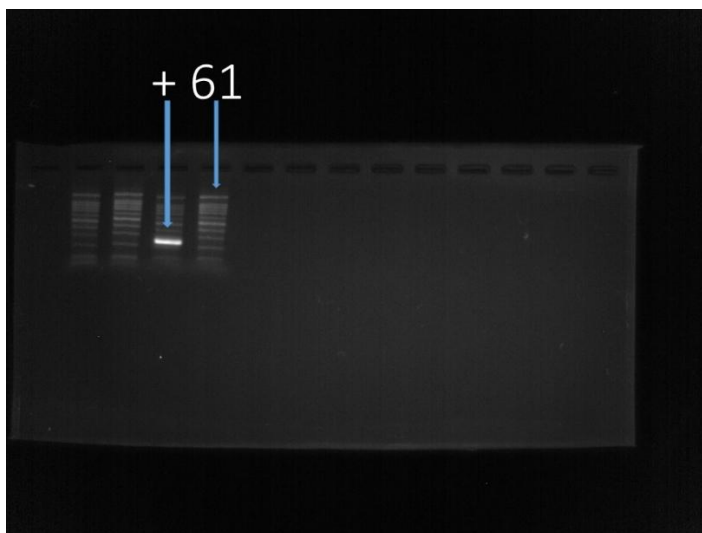


Imagen 34. Resultado de electroforesis observado mediante el fotodocumentador

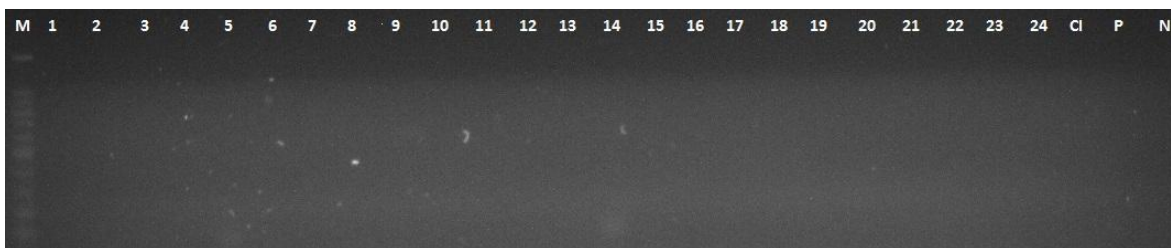
Imágenes de lecturas en el fotodocumentador, procedimiento final realizado a cada una de las muestras



Después de realizar un sin número de pruebas con el equipo de electroforesis con resultados negativos, donde la muestra ni los controles muestran imagen alguna, se decide que dichas muestras sean procesadas nuevamente por el personal del laboratorio CORPAVET arrojando resultados similares con la siguiente argumentación científica.

En las siguientes imágenes se muestran los resultados de electroforesis a las muestras procesadas en tan solo es un poco notorio el marcador de peso molecular y el positivo del kit, No se observa que ninguna de las muestras

haya corrido a través del gel.



Imágenes de resultado de electroforesis y observadas mediante el fotodocumentador

11. CONCLUSIONES

Se pudo evidenciar la efectividad del uso del protocolo Qiaamp DNA mini and blood en la extracción de ADN y su evaluación mediante la aplicación de fluorimetría en 150 muestras de ADN de suero canino, encontrando similares resultados a los hallados por Cuevas y Cárdenas en 2018 aplicando similares procedimientos en sueros de búfalos.

El diagnóstico de animales afectados por leishmaniosis es importante en salud pública por ser esta especie un hospedador intermediario y por su cercanía con el hombre nos predispone a que nos transmita la enfermedad.

La técnica de PCR es uno de los métodos más sensible y específicas para llegar al diagnóstico de una enfermedad, esta es una de las nuevas evaluaciones para profundizar sobre los diagnósticos más precisos (Montalvo et al 2014).

Se evidencio que el ADN de las muestras puede desnaturalizarse al tener variaciones de conservación de dicho ADN, lo que demostró que se deben ser conservar las muestras en neveras que logren temperaturas de hasta – 96 grados.

12.BIBLIOGRAFÍA

- Añez N., Rojas A., Vargas E., Medina V., Crisante G., Yépez J. (2012). Estudio epidemiológico sobre leishmaniasis visceral en la región semiárida del occidente de Venezuela con especial referencia a la detección de infecciones inaparentes. Boletín de malariología y salud ambiental Vol. LII, N° 2, agosto-diciembre, 2012.
- Barnes, J. C., Stanley, O., & Craig, T. M. (1993). Diffuse cutaneous leishmaniasis in a cat. J Am VetMedAssoc, 202(3), 416-418.
- Bonfante-Garrido, R., Urdaneta, R., Urdaneta, I., & Alvarado, J. (1990). Natural infection of Lutzomyia trinidadensis (Diptera: Psychodidae) with Leishmania in Barquisimeto, Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz, 85(4), 477.
- Craig, T. M., Barton, C. L., Mercer, S. H., Droleskey, B. E., & Jones, L. P. (1986). Dermal leishmaniasis in a Texas cat. Am J Trop Med Hyg, 35(6), 1100-1102
- De Souza, A. I., Barros, E. M., Ishikawa, E., Ilha, I. M., Marin, G. R., & Nunes, V. L. (2005). Feline leishmaniasis due to Leishmania (Leishmania) amazonensis in Mato Grosso do Sul State, Brazil. Vet Parasitol, 128(1-2), 41-45.
- Garcia L., Kindt A, Bermúdez H, Llanos Cuentas A, De Doncker S, Arévalo J, et al. 2004. Culture-independent species typing of neotropical Leishmania for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. J Clin Microbiol;42:2294-7
- Gómez, N.; Estevez, O.; Gisbert, M.A.; Blanco, A.; Castillo, V; Wolberg, A. (2011). Leishmaniosis Visceral en los Caninos y Felinos: Actualización. Vet. Arg. – Vol. XXVIII – N° 282 – Octubre 2011.

Helmenstine, Anne Marie (2018) Science, Tech, Math › Science Electrophoresis Definition and Explanation What Electrophoresis Is and How It Works.

Hernández Hernández, González Pérez. (2002) Introducción al análisis instrumental. Editorial Ariel, 2002. ISBN 8434480433. Pág. 105.

- Hervas J, Pérez J, Chacón F et al. (2002). Evaluation of local immunoresponse in feline leishmaniosis. Proceedings 27 WSAVA Congress, 2002.
- Lachaud L; Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. (2001). Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of Canine Visceral Leishmaniasis. J Clin Microbiol 2001;40(1):210-215.
- López, A. (2013). Fe-SODe: Diagnóstico Y Seroprevalencia De La Leishmaniasis Y La Enfermedad De Chagas En México. Tesis Doctoral. Editorial de la Universidad de Granada. ISBN: 978-84-9028-758-3.
- Mancianti F. (2004) Feline Leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat. Parasitologia, 2004; 46(1-2): 203-206.
- Manna L, Reale S, Vitale F, Gravino A, Gravino AE. (2009). Evidence for a relationship between Leishmania load and clinical manifestations. Res Vet Sci 2009;87(1):76-8.
- Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. (2007). Infection of sandflies by a cat naturally infected with leishmania infantum. Vet Parasitol, 2007; 145 (83-4): 357-360.
- Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez F. Infection by leishmania infantum in cats: epidemiological study in Spain. Vet Parasitol, 2007; 145 (3-4): 267-273
- Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. (2005). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infections in dogs. J Clin Microbiol 2005;43(11):5515-5519.

Montalvo-Álvarez AM, Folgueira C, Carrión J, Monzote-Fidalgo L, Cañavate C, Requena JM. The Leishmania HSP20 is antigenic during natural infections, but, as DNA vaccine, it does not protect BALB/c mice against experimental *L. amazonensis* infection. J BiomedBiotechnol. 2008;2008:695432. doi: 10.1155/2008/695432. [[Links](#)]

Montalvo AM, Fraga J, Rodríguez O, Blanco O, Llanos-Cuentas A, García AL, et al. Detección de Leishmaniaspp. en base al gen que codifica la proteína HSP20. RevPeruMedExp Salud Publica. 2014;31(4):635-43.

° Navarro JA, Sánchez J, Peñafiel-Verdú C, Buendía AJ, Altimira J, Vilafranca (2010) M. Histopathological lesions in 15 cats with leishmaniosis. J Comp Pathol. 2010 Nov;143(4):297-302.

- Ozon, C., Marty, P., Pratlong, F., Breton, C., Blein, M., Lelievre, A., et al. (1998). Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. VetParasitol, 75(2-3), 273-277.

- Palatnik-De-Sousa CB, Wania R, Franca-Silva JC, Da Costa RT, Reis BA, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O. (2001). Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral Leishmaniasis in Brazil. The Am Soc Trop Med Hyg 2001;65(5):510-517.

- Passos, V. M., Lasmar, E. B., Gontijo, C. M., Fernandes, O. & Degraeve, W. (1996). Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 91(1), 19-20.

- Pennisi M.G. (2002). A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. Proceedings of the leishmaniasis forum, 2002 Spain. Pag 39-48.

- Pennisi M.G. (2007). Leishmaniosis felina. Canis et felis, 2007; 89: 112-126.

- Pennisi MG, Maxia L, Vitale F, Masucci m, Borruto G, Caracappa S. Studio dell'infezione da leishmania mediante PCR in gatti che vivono in zona endemica. Atti Società Italiana di Scienze Veterinarie, 2000; 54: 215-216.
- Poli, A., Abramo, F., Barsotti, P., Leva, S., Gramiccia, M., Ludovisi, A., et al. (2002). Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. Vet Parasitol, 106(3), 181-191.
- Quaresma PF, Murta SMF, Ferreira EDC, Da Rocha-Lima AC, Prates AA, Ferreira CM. (2009). Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. Acta Trop 2009;111(3):289-94.
- Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. Journal Clin Microbiol 2007;45:21-5.
- Savani, E. S., de Oliveira Camargo, M. C., de Carvalho, M. R., Zampieri, R. A., dos Santos, M. G., D'Auria, S. R., et al. (2004). The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, Sao Paulo State, Brazil. Vet Parasitol, 120(3), 229-233.
- Simoes-Mattos L, Mattos MR, Teixeira MJ et al. (2005). The susceptibility of domestic cats (*feliscatus*) to experimental infection with *leishmanibraziliensis*. Vet Parasitol, 2005; 127 (3-4): 199-208.
- Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer LF. (2001). Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. J Clin Microbiol 2001;39(2):560-563.
- Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortés A, Iniesta L et al. (2007). Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniosis in ecoregions around the northwestern mediterranean. Am J Trop Med Hyg, 2007; 76 (4): 676-680.

- Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H. (2009). Leishmania spp. And/or Trypanosoma cruzi diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. Vet Parasitol 2009;164(2-4):118-123.
- World Health Organization WHO 2007 [sede Web]. Ginebra, Suiza: World Health Organization, [actualizado 11 de mayo de 2007, acceso mayo 2007]. TDR diseases. Disponible en: <http://www.who.int/tdr/diseases/default.htm>
- Zambrano, C. Gutiérrez, P. (2011). Situación de la leishmaniasis en Colombia. Biomédica 2011;31(sup.3):3-315-

NOTA: AGRADECEMOS AL GRUPO DE INVESTIGACIÓN KYRON Y AL SEMILLERO IN VITRO POR PERMITIRNOS PARTICIPAR EN ESTE PROYECTO.

RECONOCEMOS LA ARDUA LABOR REALIZADA POR EL DOCTOR **FRANK BARREIRO SÁNCHEZ** AL PARTICIPAR EN LA ELABORACIÓN DE ESTE PROYECTO QUE FINALIZAMOS CON LOS RESULTADOS ANTES MENCIONADOS.

Anexos

En la siguiente imagen nos muestra parte del equipo de trabajo del semillero de investigación INVITRO quienes realizamos diferentes investigaciones al tiempo.





Equipo científico del semillero de investigación INVITRO (Foto Autor)