

Artículo original

Aplicación de un método de extracción de ADN a partir de sangre canina sensible y de bajo costo para el diagnóstico molecular de *Leishmania* sp.

Application of a sensitive and low cost method for the extraction of DNA from canine blood to the molecular diagnosis of Leishmania sp.

Mariano E. Ascencio^{1,2}, Mónica Florin-Christensen^{1,2,3}, Leonhard Schnittger^{1,2,3}, Anabel E. Rodríguez²

¹Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

²Instituto de Patobiología, CICVyA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)

³Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad de Morón (UM)

e-mail: rodriguez.anabel@inta.gob.ar

Manuscrito recibido el: 31 de julio de 2017; aceptado para su publicación: 28 de noviembre de 2017

Resumen

La leishmaniosis canina (LC) es una enfermedad causada por hemoparásitos del género *Leishmania*. Los parásitos se transmiten a través de vectores flebótomos a los seres humanos y a otros mamíferos, generando cuadros tegumentarios y viscerales. Varios estudios han demostrado la eficacia de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico molecular de LC. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método de extracción de ADN de *Leishmania* sp. para su aplicación en el diagnóstico molecular de LC en muestras de sangre canina. Para ello, se comparó la eficiencia de la resina Chelex 100 con la de un kit comercial y con el método tradicional de fenol-cloroformo, para extraer ADN de una muestra de sangre de un perro infectado con *L. infantum*. En el caso de Chelex 100, se evaluaron diferentes protocolos y se eligió el más conveniente. Para analizar los resultados, se amplificó por PCR un segmento de nucleótidos específico para *Leishmania* sp. en diluciones seriadas del ADN obtenido, y se registró la máxima dilución para la que se obtuvo una banda de amplificación. Los tres métodos mostraron una sensibilidad similar, hallándose detección hasta una dilución de 3×10^{-4} de la muestra original. Cuando la muestra de ADN extraída por Chelex 100 fue congelada a -20 °C durante 30 y 60 días, se observó que no hubo diferencias en la sensibilidad de la detección luego de estos periodos de almacenamiento. Comparado con el kit comercial, el método de Chelex 100 es 10 veces más económico y el doble de rápido. Estos resultados nos permiten concluir que el método de Chelex 100 constituye una herramienta rápida, sencilla, sensible y económica para la extracción de ADN de *Leishmania* sp. Es importante destacar que la obtención de muestras de sangre para la detección de LC constituye una técnica menos invasiva que el muestreo de médula ósea utilizado rutinariamente para este fin. En conclusión, al facilitar significativamente el diagnóstico de LC, nuestro trabajo tiene el potencial de mejorar la vigilancia epidemiológica y el manejo de esta enfermedad.

Palabras Clave: *Leishmania*, leishmaniosis canina, extracción de ADN, Chelex 100, sangre

Abstract

Canine leishmaniasis (CL) is a disease caused by hemoparasites of the genus *Leishmania*. The parasites are transmitted through sand fly vectors to humans and other mammals, generating tegumentary and visceral clinical cases. Several studies have shown the efficacy of polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of CL. The objective of this work was to develop a method for *Leishmania* sp. DNA extraction for its application to the molecular diagnosis of CL in canine

blood samples. To this end, Chelex 100 resin efficiency was compared to that of a commercial kit and the traditional phenol-chloroform method in its ability to extract DNA from a blood sample of a L. infantum-infected dog. In the case of Chelex 100, different protocols were evaluated and the most convenient was chosen. To analyze the results, a Leishmania sp.-specific nucleotide segment was amplified by PCR in serial dilutions of the extracted DNA, and the maximal dilution that yielded an amplification band was registered. The three methods showed a similar sensitivity, with detection until a dilution of the original sample of 3×10^{-4} . When the DNA sample extracted by Chelex 100 was frozen at -20°C for 30 and 60 days, no differences in the sensitivity of detection were observed after these storage periods. Compared to the commercial kit, Chelex 100 is 10 times cheaper and twice as fast. These results allow us to conclude that the Chelex 100 method is a rapid, simple, sensitive and economic tool for Leishmania sp. DNA extraction. Importantly, blood sample collection for the detection of CL is a lesser invasive technique than bone marrow sampling, which is routinely used to this end. In conclusion, by significantly facilitating its diagnosis, our work has the potential to improve CL surveillance of infection and disease management.

Keywords: Leishmania, canine leishmaniosis, DNA extraction, Chelex 100, blood

Introducción

La leishmaniosis es una enfermedad zoonótica causada por protozoos del género *Leishmania* (Trypanosomatidae), parásitos intracelulares obligados del humano y otros mamíferos, que son transmitidos por el flebótomo hembra “mosca de la arena”.

La enfermedad es endémica en 98 países afectando a 12 millones de personas en el mundo, siendo predominante en regiones tropicales y subtropicales (World Health Organization, 2010). Según datos de la OMS, actualmente existen en el mundo 350 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad, y 2 millones de casos nuevos por año (Medina & Lucero, 2014; MSAL, 2010).

La leishmaniosis se manifiesta de forma tegumentaria y visceral. La leishmaniosis tegumentaria (LT) presenta como síntomas lesiones deformantes o ulcerantes en piel y/o mucosas, no resultando letal. La leishmaniosis visceral (LV) se caracteriza por desarrollar principalmente anemia y hepatoesplenomegalia pudiendo ser letal. En América Latina alcanza una tasa de mortalidad del 90% en los casos de pacientes que no recibieron tratamiento y aun del 8% en los pacientes con tratamiento (Gould *et al.*, 2013).

En Argentina, el primer caso autóctono de LV en un humano durante el año 2006 provocó la inmediata búsqueda del parásito y del vector en la zona de Posadas, Misiones (Salomon *et al.*, 2008).

La leishmaniosis se presenta en diversos animales domésticos, entre los cuales el perro es el más afectado. En

Argentina, estudios previos han demostrado que *L. infantum* y *L. braziliensis* son agentes causales de la leishmaniosis canina (LC) (Barroso *et al.*, 2015; Dantas-Torres, 2009), siendo el perro doméstico el principal reservorio para la leishmaniosis visceral.

Desde el punto de vista del diagnóstico, las leishmaniosis visceral humana y canina en Argentina son enfermedades de denuncia obligatoria por Ley 15465 (Decreto Nacional 3640/1954), por lo cual, todo caso canino que presente una prueba positiva por cualquier método, deberá ser notificado mediante una ficha individual inmediata (Ministerio de Salud, 2013).

Según el Ministerio de Salud de la Nación, los perros infectados con o sin manifestaciones clínicas son el principal reservorio de la LV para el humano, por lo cual resulta de suma importancia una vigilancia de los casos de leishmaniosis canina por laboratorio y su reporte obligatorio (Ministerio de Salud, 2013). Al igual que para LV en humanos, en Posadas, Misiones en el 2006, se diagnosticó el primer caso de LC en Argentina (Salomon *et al.*, 2008). Posteriormente se notificaron casos en otras provincias, siendo la zona del Noreste Argentino la más afectada (Nevot *et al.*, 2013).

En la práctica veterinaria, los métodos disponibles para el diagnóstico de la leishmaniosis son: el diagnóstico parasitológico, el diagnóstico serológico, el cultivo *in vitro* y el diagnóstico molecular. El diagnóstico parasitológico, que es el método estándar de oro para el diagnóstico definitivo,

consiste en la observación directa mediante microscopía de frotis de raspajes dérmicos, nódulos linfáticos, biopsia del bazo y médula ósea. Si no existe una lesión dérmica la muestra es tomada de forma invasiva para el animal. La sensibilidad de la microscopía para la LV oscila entre el 93-99% para la aspiración del bazo, 53-86% para la médula ósea, y 53-65% para los aspirados ganglionares (Srividya & Kulshrestha, 2012). El diagnóstico serológico consiste en la detección de anticuerpos anti-*Leishmania* en suero canino (p. ej.: tiras inmunocromatográficas-rK39), y una desventaja del mismo es que puede tener una especificidad baja debido a la presencia de reacciones cruzadas (Lemos *et al.*, 2008). El cultivo *in vitro* es una técnica específica, aunque es laboriosa y costosa (Mathis & Deplazes, 1995). El diagnóstico molecular es el más sensible aunque es costoso para el diagnóstico veterinario. Se realiza a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual permite determinar la presencia del parásito mediante la amplificación de una región determinada del ADN de *Leishmania* spp.

La PCR y sus variantes han sido ampliamente utilizadas en el diagnóstico de leishmaniosis en el mundo, tanto en pacientes humanos como en caninos y vectores flebótomos (Ashford *et al.*, 1995; Berrahal *et al.*, 1996; Cabrera *et al.*, 2002; Fisa *et al.*, 2002; Quaresma *et al.*, 2009; Reale *et al.*, 1999; Romero, 2008).

Esta técnica es aplicable a un espectro variado de muestras, que incluyen sangre periférica, drenaje linfático, piel y médula ósea (Manna *et al.*, 2004). Esta última es la utilizada en la actualidad para la confirmación del diagnóstico de leishmaniosis visceral (Mathis & Deplazes, 1995; Roura *et al.*, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2001). A pesar de ser ensayos altamente sensibles, no se utilizan para el diagnóstico rutinario de la infección por *Leishmania* spp., ya que requiere un paso previo de extracción de ADN en la mayoría de los casos, equipamiento especializado y materiales costosos.

Los métodos convencionales de extracción de ADN para su utilización en PCR consisten principalmente en la separación de ácidos nucleicos mediante solventes orgánicos o en la utilización de kits comerciales. Ambos métodos resultan sensibles para su aplicación en el diagnóstico. Sin embargo, la utilización de solventes orgánicos genera un riesgo para el operario, y la aplicación de kits comerciales provoca un aumento del costo por muestra. La resina Chelex 100

representa una alternativa a los métodos convencionales de extracción de ADN (Singer-Sam *et al.*, 1989). Esta resina posee alta afinidad por los iones metálicos polivalentes, lo cual protege el ADN durante la lisis térmica empleada para separarlo de otros componentes celulares (Walsh *et al.*, 1991). Se ha empleado este método para obtener ADN de *Leishmania* spp. de diversas fuentes tales como flebótomos infectados (Jorquera *et al.*, 2005), cultivo *in vitro* (Ceccarelli *et al.*, 2014; Piarroux *et al.*, 1994), raspajes dérmicos (Minodier *et al.*, 1997), médula ósea y capa leucocitaria de sangre (Reithinger *et al.*, 2000). Sin embargo, en el caso de esta última, no se ha podido amplificar correctamente mediante PCR el ADN obtenido con el método de Chelex 100. En este trabajo, nos propusimos optimizar el método de extracción de ADN a partir de sangre entera canina utilizando la resina Chelex 100 para su aplicación en el diagnóstico de LC mediante PCR. De esta forma buscamos disminuir el costo del diagnóstico a partir de este tipo de muestras cuya obtención es más sencilla y menos traumática para el animal que la utilización de biopsias o aspirados.

Materiales y Métodos

Muestras: Se tomó una muestra de sangre y una de médula ósea de un canino proveniente de la zona de Mercedes, Corrientes, por intermedio de una colaboración con la EEA-INTA de dicha localidad. La muestra de sangre fue extraída mediante venopunción y fue recolectada en un tubo Vacutainer™ (Beckton Dickinson) con citrato de sodio 3,8% como anticoagulante. La muestra de médula ósea se obtuvo mediante una punción y el aspirado de la penúltima costilla. El diagnóstico serológico se realizó previamente mediante el kit Kalazar Detect™ Canine Rapid Test (INBIOS, USA), dando un resultado positivo para *Leishmania infantum*. El diagnóstico parasitológico se llevó a cabo por observación en microscopio óptico de un frotis de médula ósea teñido con Giemsa, donde se pudieron ver amastigotes.

Extracción de ADN

Chelex 100: Partiendo de siete alícuotas de 40 μ l cada una de la muestra de sangre de un perro positivo para *Leishmania infantum* mencionada más arriba, se realizaron diferentes protocolos de extracción de ADN (Ch1-Ch7) (**Tabla 1**). Ch1: se agregaron 40 μ l de proteinasa K (20 U/mg) (Qiagen) y se incubó durante 60 minutos a 56 °C, se agregaron 400 μ l de suspensión de Chelex® 100 - BIORAD 5% y se incubó

durante 15 minutos a 100° C. Ch2: se agregaron 40 µl de proteinasa K (20 U/mg) y se incubó durante 60 minutos a 56 °C. Luego se agregaron 240 µl de suspensión Chelex 100 20% y se incubó durante 10 minutos a 100 °C. Ch3: Se agregaron 400 µl de la suspensión de Chelex 100 al 5 % y se incubó a 100 °C durante 15 minutos. Ch4: se agregaron 40 µl de proteinasa K (20 U/mg) y se incubó por 60 minutos a 56 °C. Luego se agregaron 400 µl de suspensión de Chelex 100 al 5% y se incubó nuevamente por 60 minutos a 56 °C. Ch5: Se agregaron 400 µl de la suspensión de Chelex 100 al 5 % y se incubó por 60 minutos a 56 °C. Ch6: Se agregaron 40 µl de proteinasa K (20 U/mg) y se incubó durante 60 minutos a 56 °C. Luego se incubó durante 10 minutos a 100 °C y se le agregaron 400 µl de suspensión de Chelex 100 al 5 % y se realizó una segunda incubación durante 60 minutos a 56 °C. Ch7: se le realizó el mismo tratamiento que a la alícuota 6, pero antes de almacenarla se realizó una precipitación con etanol absoluto (Biopack). Las muestras que tuvieron agregado de proteinasa K fueron homogeneizadas durante 10 segundos luego del agregado de la enzima. Al cabo de cada protocolo, las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 13.600 × g, se pasó el sobrenadante a un tubo limpio y se almacenó a -20 °C.

Tabla 1: Protocolos de extracción de ADN a partir de sangre utilizando la resina Chelex 100. SC 20%: suspensión de Chelex-100 20 %; SC 5%: suspensión de Chelex-100 5%

CHELEX-100							
Protocolo	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ch6	Ch7
SC 5%	X	-	X	X	X	X	X
Proteinasa K	X	X	-	X	-	X	X
Incubación 56 °C (60')	X	X	-	X	X	X	-
Incubación 100 °C (15')	X	X	X	-	-	-	-
Buffer de Lisis	-	SC 20%	-	-	-	X	X
Cent. 13.600 x g	X	X	X	X	X	X	X

Luego se eligió uno de los protocolos (teniendo en cuenta la sencillez, economía, rapidez y sensibilidad) para realizar una nueva extracción a partir de 100 µl de sangre.

Fenol-Cloroformo: Se partió de 100 µl de sangre entera y se llevó a cabo la extracción de ADN según el protocolo descripto por Sambrook & Green (2012) con algunas modificaciones. Se empleó una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), el ADN fue precipitado con etanol absoluto, centrifugado y lavado con etanol 70%, resuspendido en 50 µl de H₂O milli-Q®, y almacenado a -20 °C.

Kit comercial: se utilizó el kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN®) partiendo de 100 µl de sangre entera se realizó la extracción de ADN de acuerdo con las instrucciones del proveedor para muestras de sangre con células anucleadas, siendo el volumen final de elución de 100 µl, y se almacenó a -20 °C. Se llevó a cabo otra extracción partiendo de 40 µl de médula ósea, obteniendo una elución final de 100 µl para su utilización como control positivo, y se almacenó a -20 °C.

Amplificación de ADN por PCR

La amplificación del ADN extraído por cada método se llevó a cabo según Rodgers *et al.* (1990). Los cebadores utilizados en la PCR fueron: 13A (5'-GTGGGGGAGGGCGTTCT-3) y 13B (5'-ATTTTACCAACCCCGATT-3'), que amplifican un fragmento de 116 pb correspondiente a la región constante del minicírculo del kinetoplasto de *Leishmania* (Reale *et al.*, 1999). Brevemente, la reacción de PCR se hizo en un volumen final de 25 µl conteniendo Buffer (1x) Green GoTaq (Promega); 1,8 mM MgCl₂ (Fermentas); 0,2 mg/ml BSA (seroalbúmina bovina); 0,2 µM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP; 0,28 µM de cada cebador (13A y 13B) y 0,025 U/ml de ADN Taq polimerasa (GoTaq, Promega), 1 µl de ADN obtenido por los métodos antes descriptos. Para el control positivo se utilizó 1 µl de ADN extraído mediante kit comercial a partir de médula ósea, mientras que para el control negativo de contaminación se empleó 1 µl de agua bidestilada en lugar de templado.

Las muestras se amplificaron con 35 ciclos (1 min a 94 °C, 1 min a 54 °C y 1 min a 72 °C) en un termociclador (Ivema, T18). Los resultados de la amplificación fueron verificados por electroforesis en gel de agarosa (1,8%) utilizando bromuro de etidio como agente intercalante del ADN. Como marcador de tamaño de ADN se utilizó GeneRuler®100bp DNA Ladder (Promega) o GeneRuler®1KbPlus (Termo Scientific).

Comparación de sensibilidad de Chelex 100 con métodos convencionales

Tres alícuotas de 100 µl de la muestra de sangre

canina positiva para *Leishmania infantum* mencionada anteriormente fueron extraídas mediante los métodos de kit comercial, fenol-cloroformo y Chelex 100 empleando los protocolos antes mencionados. Se realizaron diluciones seriadas (1 a 10^{-7}) del ADN obtenido y se amplificaron por PCR. Luego de analizar los productos de amplificación por electroforesis horizontal en gel de agarosa, se registró la máxima dilución donde se observaron productos de amplificación en cada caso.

Estabilidad de muestras durante su almacenamiento

Una alícuota de ADN extraído mediante Chelex 100 se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por períodos de 30 y 60 días. Luego de cada período, fue descongelada a temperatura ambiente y evaluada mediante amplificación por PCR a partir de diluciones seriadas, como se describió anteriormente.

Resultados

Elección de un protocolo de extracción de ADN utilizando la resina Chelex 100

Las muestras de ADN obtenidas a partir de sangre entera canina mediante los siete protocolos de extracción con Chelex 100 descriptos en la **Tabla 1**, fueron utilizados como templado para amplificar por PCR un segmento de 116 pb de *Leishmania* sp. En todos los casos, al igual que el control positivo, se obtuvo una banda correspondiente a ese tamaño cuando se analizaron los productos de amplificación por electroforesis horizontal (**Fig.1**). El protocolo Ch3 consta únicamente de una incubación ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min) y una centrifugación ($13.600 \times g$ por 10 min), por lo cual resultó el más sencillo y rápido de todos. Dado que los resultados fueron similares en todos los protocolos, el Ch3 fue el método de elección para los siguientes experimentos.

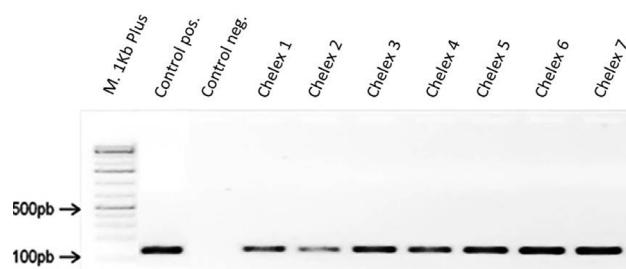


Figura 1. Evaluación de diferentes protocolos de extracción de ADN con Chelex-100. M: Marcador de peso molecular 1KbPlus, C-: control negativo, Ch1-Ch7: diferentes protocolos aplicados, C+: control positivo.

Para comparar la sensibilidad de los métodos de extracción

de ADN analizados, se utilizaron como templados para la PCR, diluciones seriadas del ADN aislado por cada uno de los tres métodos y se registró la máxima dilución en la que se obtuvo una amplificación positiva. Los resultados obtenidos muestran amplificación hasta una dilución de 3×10^{-4} de la muestra original en los tres casos (**Fig. 2**).

En cuanto a la estabilidad de la muestra extraída mediante Chelex 100, almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descongelada a los 30 y 60 días, se observó que en ambos tiempos se conserva la misma sensibilidad en la detección por PCR con respecto de la detección inicial.

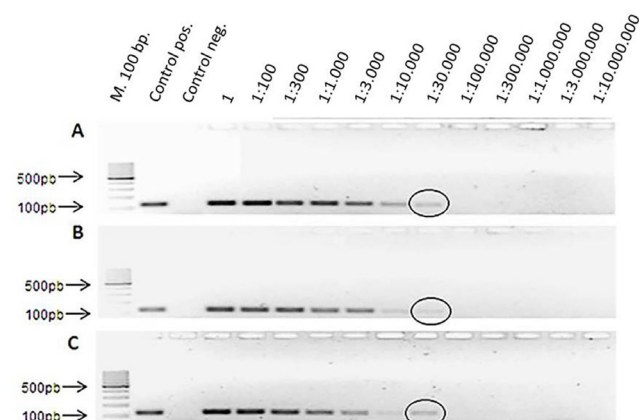


Figura 2. Amplificaciones de diluciones seriadas para los tres métodos de extracción. A=Extracción con Chelex-100, B=Extracción con Fenol-Cloroformo y C=Extracción con kit comercial. (MK= marcador de ADN GeneRuler® 100bp; C - = Control negativo; C + = Control positivo)

Discusión y Conclusiones

En Argentina, la leishmaniosis canina se encuentra en expansión, y diversos estudios han demostrado que la reemergencia de la enfermedad se encuentra asociada a diversos factores de riesgo (Salomón et al., 2004; Salomón et al., 2015). Según el Ministerio de Salud de la Nación, la principal medida de control consiste en erradicar el flebótomo de los hogares para evitar la infección de los caninos. Si bien los métodos utilizados actualmente para interrumpir el ciclo vectorial son efectivos, la necesidad de un control integrado de la enfermedad sigue vigente (Otranto et al., 2010; Reithinger et al., 2004). La aplicación de un diagnóstico sensible y rápido es fundamental para minimizar los riesgos de transmisión de la enfermedad. Estudios previos demuestran que la sensibilidad del diagnóstico de leishmaniosis canina mediante PCR resulta

superior a otras técnicas de rutina (Lemos *et al.*, 2008; Quinnell *et al.*, 2013), y ha sido aplicado con éxito al diagnóstico de la misma (Barbiéri *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2010; Mohammadiha *et al.*, 2013; Quaresma *et al.*, 2009). Se ha demostrado que utilizando el par de cebadores 13A y 13B, que hibridizan con y amplifican una secuencia blanco del genoma del kinetoplasto, la PCR tiene una sensibilidad de 10^{-3} parásitos por mililitro (Lachaud *et al.*, 2002). Por esta alta sensibilidad, este par de cebadores es ampliamente utilizado para el diagnóstico de LC (Reale *et al.*, 1999). Se ha demostrado también que el método de PCR con los cebadores 13A y 13B es altamente específico para *Leishmania* spp. y no amplifica otros microorganismos co-infectantes (Reale *et al.*, 1999).

Nuestro principal objetivo fue establecer un protocolo económico, rápido y sencillo para la extracción de ADN para ser utilizado en la detección por PCR de *Leishmania* sp., utilizando una muestra de sangre periférica canina. La obtención de este tipo de muestra tiene la ventaja de ser sencilla, fácilmente repetible y menos invasiva y estresante para el animal en comparación con la médula ósea, la piel o el muestreo de ganglios linfáticos. Esto repercute en un mejor diagnóstico, contribuye al bienestar animal y mejora la predisposición de los dueños de los caninos para someterlos al test.

En nuestro trabajo, demostramos que el método de Chelex 100 resulta apto para la extracción de ADN de *L. infantum* a partir de muestras de sangre canina para su utilización en PCR. En otro estudio se extrajo ADN con la resina Chelex 100 a partir de sangre canina (capa leucocitaria), pero no se observó amplificación por PCR (Reithinger *et al.*, 2000). Esto pudo deberse a la diferencia en el protocolo de extracción de ADN, a la muestra empleada o a la sensibilidad de los cebadores utilizados. Nuestros resultados muestran que se amplificaron todos los ADN extraídos por los diferentes protocolos probados, pudiendo observar en un gel de agarosa una única banda a la altura esperada (aproximadamente 120 pb), siendo las intensidades de las bandas más fuertes para los protocolos Ch3, 5, 6 y 7. Los protocolos Ch 5, 6 y 7 incluyen una mayor cantidad de pasos en la extracción aumentando el tiempo y la cantidad de reactivos. El protocolo Ch5 incluye un paso de incubación de 60 minutos a 56 °C, lo cual además de requerir más tiempo que el protocolo Ch3, necesita de un baño termostático. En el protocolo Ch6 se incluye el agregado de proteinasa K que es

una proteasa que libera el ADN nuclear al medio y degrada proteínas. Sumado a lo anterior, en el protocolo Ch7, se utiliza etanol para precipitar el ADN con el fin de concentrarlo y purificarlo. Estos procedimientos si bien fueron efectivos, aumentan costos y tiempo al procedimiento, y en este caso no fueron necesarios para la amplificación del ADN. Por estos motivos, se eligió el protocolo Ch3, ya que resulta más económico, sencillo y rápido, empleando un calentamiento a 100 °C y un tiempo aproximado de 30 minutos en total. Esto representa una ventaja significativa para su aplicación en el diagnóstico veterinario.

Realizamos una comparación de la sensibilidad del ADN extraído por el método Chelex 100 siguiendo el protocolo Ch3, con otros métodos convencionales (kit comercial y fenol-cloroformo), observando una sensibilidad similar para los tres métodos. También se evaluó la estabilidad del ADN extraído por Chelex 100 al almacenarlo a -20 °C, durante 30 y 60 días. En ambos tiempos se observó la misma sensibilidad que para el ADN sin almacenar. Estos resultados deberán, en etapas posteriores, ser confirmados en muestras conteniendo números conocidos de parásitos provenientes de cultivos de distintas especies de *Leishmania*.

Por otra parte, es importante recalcar que la resina Chelex 100 tiene la ventaja de no generar residuos tóxicos ni efectos adversos para la salud del operario, como en el caso de las técnicas que emplean solventes orgánicos. Además, considerando valores actuales, el método de Chelex 100 resulta 10 veces más económico que el método de kit comercial, teniendo como costos por muestra 0,20 USD y 2,00 USD, respectivamente. Al mismo tiempo la extracción de ADN por el método Chelex 100 elegido es 2 veces más rápida que por el método de kit comercial.

En base a lo expuesto, y debido a las ventajas que presenta el método, creemos que la extracción de ADN a partir de sangre entera utilizando la resina Chelex 100 contribuye a mejorar el diagnóstico de la leishmaniosis canina en Argentina. En nuestro laboratorio se está evaluando la utilidad de este método en muestras de campo.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Fundación Universidad de Morón (PID9-2015) y el INTA (PNSA 1115052). Se agradece al Med. Vet. Nestor Sarmiento (EEA-INTA Mercedes, Corrientes) por la provisión de las muestras.

Referencias bibliográficas

- Ashford, D. A., Bozza, M., Freire, M., Miranda, J. C., Sherlock, I., Eulalio, C., ... Barker, R. H. (1995). Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53(3), 251-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7573707>
- Barbiéri, C. L. (2006). Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 28(7), 329-37. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00840.x>
- Barroso, P. A., Marco, J. D., Locatelli, F. M., Cardozo, R. M., Hoyos, C. L., Mora, M. C., ... Basombrío, M. A. (2015). Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum* in Salta, Argentina: Possible Reservoirs and Vectors. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(2), 334-9. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0267>
- Berrahal, F., Mary, C., Roze, M., Berenger, A., Escoffier, K., Lamouroux, D., & Dunan, S. (1996). Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 55(3), 273-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8842114>
- Cabrera, O. L., Munsterman, L. E., Cárdenas, R., Gutiérrez, R., & Ferro, C. (2002). Definition of appropriate temperature and storage conditions in the detection of *Leishmania* DNA with PCR in phlebotomine flies. *Biomedica : Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 22(3), 296-302.
- Ceccarelli, M., Galluzzi, L., Migliazzo, A., & Magnani, M. (2014). Detection and characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. *PloS One*, 9(2), e88845. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0088845>
- Cruz, I., Acosta, L., Gutiérrez, M. N., Nieto, J., Cañavate, C., Deschutter, J., & Bornay-Llinares, F. J. (2010). A canine leishmaniasis pilot survey in an emerging focus of visceral leishmaniasis: Posadas (Misiones, Argentina). *BMC Infectious Diseases*, 10(1), 342. <http://doi.org/10.1186/1471-2334-10-342>
- Dantas-Torres, F. (2009). Canine leishmaniasis in South America. *Parasites & Vectors*, 2 Suppl 1, S1. <http://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S1>
- Fisa, R., Riera, C., Ribera, E., Gállego, M., & Portús, M. (2002). A nested polymerase chain reaction for diagnosis and follow-up of human visceral leishmaniasis patients using blood samples. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96, S191-S194. [http://doi.org/10.1016/S0035-9203\(02\)90075-1](http://doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90075-1)
- Gould, I. T., Saavedra, S. B., Bezzi, G., y Maglianese, M. I. (2013). Leishmaniasis Visceral en la Argentina - Notificación y Situación Vectorial (2006-2012). *Medicina*, 73, 104-110.
- Jorquera, A., González, R., Marchán-Marcano, E., Oviedo, M., & Matos, M. (2005). Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(1), 45-48. <http://doi.org/10.1590/S0074-02762005000100008>
- Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J. P., & Bastien, P. (2002). Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), 210-215. <http://doi.org/10.1128/JCM.40.1.210-215.2002>
- Lemos, E. M., Laurenti, M. D., Moreira, M. A. B., Reis, A. B., Giunchetti, R. C., Raychaudhuri, S., & Dietze, R. (2008). Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Tropica*, 107(2), 205-7. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.04.023>
- Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L. M., Morte, R. Della, ... Gravino, A. E. (2004). Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 125(3-4), 251-62. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.019>
- Marlyn H. Romero, López, M. C., Echeverry, M. C., & Rivas, F. A. (2008). Canine Visceral Leishmaniasis: Diagnostic tests do not detect real state of the infection.

- Rev. Salud Pública*, 10(2), 290–298. <http://doi.org/S0124-00642008000200009> [pii]
- Mathis, A., & Deplazes, P. (1995). PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(5), 1145-9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=228120&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 - Medina, M. G., & Lucero, H. (2014). Aplicación de herramientas moleculares en el diagnóstico y caracterización de *Leishmania* spp. en áreas endémicas de Chaco, Argentina: a propósito de un caso. *Revista Argentina de Zoonosis Y Enfermedades Infecciosas Emergentes*, 9(2), 51-53.
 - Ministerio de Salud. (2013). Boletín integrado de vigilancia - Secretaría de promoción y programas sanitarios.
 - Minodier, P., Piarroux, R., Gambarelli, F., Joblet, C., & Dumon, H. (1997). Rapid identification of causative species in patients with Old World leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(10), 2551-5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=230009&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 - Mohammadiha, A, Haghghi, A, Mohebbali, M., Mahdian, R., Abadi, A R., Zarei, Z., ... Mahmoudi, M. R. (2013). Canine visceral leishmaniasis: a comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of *Leishmania infantum* infection. *Veterinary Parasitology*, 192(1-3), 83–90. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.10.013>
 - MSAL. (2010). *Leishmaniasis Visceral - Guía para el equipo de salud N° 5*. Retrieved from <http://www.msal.gob.ar/images/stories/epidemiologia/pdf/guia-leish.pdf>
 - Nevot, C., Rosa, A., & Eiras, D. (2013). Actualidad en leishmaniasis canina. Retrieved from <http://www.veterinariargentina.com/revista/2013/09/actualidad-en-leishmaniasis-canina/>
 - Otranto, D., de Caprariis, D., Lia, R. P., Tarallo, V., Lorusso, V., Testini, G., ... Stanneck, D. (2010). Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: A longitudinal field study. *Veterinary Parasitology*, 172(3-4), 323-332. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.05.017>
 - Piarroux, R., Gambarelli, F., Dumon, H., Fontes, M., Dunan, S., Mary, C., ... Quilici, M. (1994). Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(3), 746-9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=263118&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 - Quaresma, P. F., Murta, S. M. F., Ferreira, E. D. C., da Rocha-Lima, A. C. V. M., Xavier, A. A. P., & Gontijo, C. M. F. (2009). Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Tropica*, 111(3), 289-94. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.05.008>
 - Quinnell, R. J., Carson, C., Reithinger, R., Garcez, L. M., & Courtenay, O. (2013). Evaluation of rK39 rapid diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(1), e1992. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001992>
 - Reale, S., Maxia, L., Vitale, F., Glorioso, N. S., Caracappa, S., & Vesco, G. (1999). Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(9), 2931-2935. [http://doi.org/10.1016-0095-1137/99/\\$04.00+0](http://doi.org/10.1016-0095-1137/99/$04.00+0)
 - Reithinger, R., Coleman, P. G., Alexander, B., Vieira, E. P., Assis, G., & Davies, C. R. (2004). Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *International Journal for Parasitology*, 34(1), 55-62. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.09.006>
 - Reithinger, R., Lambson, B. E., Barker, D. C., & Davies, C. R. (2000). Use of PCR to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in dog blood and bone marrow. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(2), 748-51. <http://doi.org/http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10655379>

- Rodgers, M. R., Popper, S. J., & Wirth, D. F. (1990). Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. *Experimental Parasitology*, 71(3), 267-75. [http://doi.org/10.1016/0014-4894\(90\)90031-7](http://doi.org/10.1016/0014-4894(90)90031-7)
- Roura, X., Sanchez, A., & Ferrer, L. (1999). Diagnosis of canine leishmaniasis by a Polymerase Chain Reaction. *Veterinary Record*, 144(10), 262-264. <http://doi.org/10.1136/vr.144.10.262>
- Salomón, O. D., Feliciangeli, M. D., Quintana, M. G., Afonso, M. M. D. S., & Rangel, E. F. (2015). Lutzomyia longipalpis urbanisation and control. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(7), 831-46. <http://doi.org/10.1590/0074-02760150207>
- Salomón, O. D., Wilson, M. L., Munstermann, L. E., & Travi, B. L. (2004). Spatial and temporal patterns of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis focus in northern Argentina. *Journal of Medical Entomology*, 41(1), 33–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14989343>
- Salomon, O., Sinagra, A., Nevot, M., Barberian, G., Paulin, P., Estevez, J., ... Estevez, J. (2008). First visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), 109-11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18368242>
- Sambrook, J., & Green, M. R. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Singer-Sam, J., Tanguay, R. L., & Riggs, A. D. (1989). Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications*, 3(11).
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., & Ferrer, L. (2001). Prevalence of Leishmania infantum infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), 560-3. <http://doi.org/10.1128/JCM.39.2.560-563.2001>
- Srividya, G., & Kulshrestha, A. (2012). Diagnosis of visceral leishmaniasis : developments over the last decade, 1065–1078. <http://doi.org/10.1007/s00436-011-2680-1>
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. (1991). Biotechniques 30th anniversary gem Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 10(3), 506-513. <http://doi.org/10.2144/000113897>
- World Health Organization. (2010). Control of the leishmaniasis. *World Health Organization Technical Report Series*, (949). <http://doi.org/10.1038/nrmicro1766>.