



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

"Protocolos de extracción de material genético de excretas de palomas (*Columba livia*) para la detección de hongos patógenos mediante ensayos LAMP"

Trabajo de titulación previo a
la obtención del título de
Médico Veterinario
Zootecnista.

Autoras:

Angélica Lucía Corte Pérez

CI: 0104985023

Correo electrónico: angy_crt@outlook.com

María Karina Sánchez Bueno

CI: 0105587398

Correo electrónico: karina.sanchez25@ucuenca.edu.ec

Directora:

Dra. María Silvana Méndez Álvarez. Mg.

CI: 0102606373

Cuenca, Ecuador

10-marzo-2021



RESUMEN

Los hongos patógenos son causantes de micosis infecciosas en humanos y animales. La paloma doméstica (*Columba livia*) es uno de los principales reservorios de estos hongos que pueden ser aspirados produciendo una serie de trastornos respiratorios y sistémicos. El objetivo de esta investigación fue evaluar protocolos para la extracción de material genético de palomas y hongos patógenos en muestras de excretas de palomas mediante 4 protocolos (A, B, C y D) con la utilización de métodos físicos, químicos y enzimáticos para después determinar la cantidad, calidad, integridad y la viabilidad del material genético obtenido con estos protocolos mediante ensayos LAMP. Los hongos patógenos son diagnosticados con técnicas de cultivo, microscopía, serología por lo que implementar una técnica de biología molecular ofrece una herramienta eficaz de diagnóstico de estos hongos en palomas y su relación con la salud pública. Para este estudio se tomaron muestras de excretas secas de los nidales y de excretas húmedas de la cloaca de las aves en puntos estratégicos de alta densidad de palomas. En el análisis estadístico de la cantidad y calidad de ADN obtenido se realizó la estimación de medias mediante el programa Ky.Plot 5.0 y la prueba de Duncan en la cual la cantidad medida mediante concentración de ADN fue mayor en los protocolos de los extractos de excretas secas que en las húmedas y la calidad para el protocolo C de excretas secas y húmedas se encontró en el parámetro ideal de ratio 260/280; con relación al análisis de integridad se realizó la tabla de contingencia de frecuencias relativas mediante el programa Infostat. Los resultados obtenidos para la amplificación por ensayos LAMP fueron negativos para cada uno de los protocolos en los dos tipos de extractos ya sea excretas secas o húmedas.

Palabras clave: Hongos patógenos. ADN. Palomas. Excretas. LAMP.



ABSTRACT

Pathogenic fungi are the cause of infectious mycoses in humans and animals. The domestic pigeon (*Columba livia*) is one of the main reservoirs of these fungi that can be aspirated producing a series of respiratory and systemic disorders. The objective of this research was to evaluate protocols for the extraction of pigeon genetic material and pathogenic fungi in pigeon excreta samples through 4 protocols (A, B, C and D) with the use of physical, chemical and enzymatic methods to later determine the quantity, quality, integrity and viability of the genetic material obtained with these protocols using LAMP assays. Pathogenic fungi are diagnosed with culture techniques, microscopy, and serology, so implementing a molecular biology technique offers an effective diagnostic tool for these fungi in pigeons and their relationship with public health. For this study, samples of dry excreta from nest boxes and wet excreta from the cloaca of birds were taken at strategic points of high density of pigeons. In the statistical analysis of the quantity and quality of DNA obtained, the estimation of means was performed using the Ky.Plot 5.0 program and Duncan's test in which the quantity measured by DNA concentration was higher in the protocols of the dry excreta extracts than in the wet ones and the quality for the C protocol of dry and wet excreta was found in the ideal parameter of ratio 260/280; in relation of the integrity analysis, the contingency table of relative frequencies was made using the Infostat program. The results obtained for the amplification by LAMP assays were negative for each one of the protocols in the two types of extracts, whether dry or wet excreta.

Keywords: Pathogenic fungi. DNA. Pigeons. Excreta. LAMP.



ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ÍNDICE DE CONTENIDO	3
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE ANEXOS	9
DEDICATORIA	14
AGRADECIMIENTOS	15
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	16
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN	17
1.1 Objetivos	20
1.1.1 Objetivo general	20
1.1.2 Objetivos específicos.....	20
1.2 Hipótesis	20
CAPITULO II: REVISIÓN DE LITERATURA	21
2.1 Columba livia.....	21
2.2 Hongos	21
2.2.1 Generalidades	21
2.2.2 Mecanismos patogénicos	22
2.3 Hongos oportunistas	23
2.3.1 <i>Cryptococcus neoformans</i>	23
2.3.1.1 Morfología	23
2.3.1.2 Clasificación y reproducción	24
2.3.1.3 Susceptibilidad a los desinfectantes y antifúngicos	25
2.3.1.4 Hábitat natural	25
2.3.1.5 Aislamiento, crecimiento y características de la colonia	26
2.3.1.6 Transmisión	26
2.3.1.7 Patogénesis	27
2.3.1.8 Diagnóstico	28
2.3.2 <i>Histoplasma capsulatum</i>	28
2.3.2.1 Morfología	28
2.3.2.2 Clasificación y reproducción	29
2.3.2.3 Susceptibilidad a los desinfectantes	30



2.3.2.4	Hábitat Natural	30
2.3.2.5	Aislamiento y crecimiento	31
2.3.2.6	Transmisión	31
2.3.2.7	Patogénesis	31
2.3.2.8	Diagnóstico	32
2.3.3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	33
2.3.3.1	Morfología	33
2.3.3.2	Clasificación y reproducción	34
2.3.3.3	Susceptibilidad a los desinfectantes	35
2.3.3.4	Hábitat natural y distribución.....	35
2.3.3.5	Aislamiento y crecimiento	35
2.3.3.6	Transmisión	36
2.3.3.7	Patogenicidad.....	36
2.3.3.8	Diagnóstico	37
2.4	Ensayos Moleculares	38
2.4.1.	Características de los ensayos	38
2.4.1.1	LAMP	38
2.4.1.2	PCR.....	39
2.4.2	Sensibilidad y especificidad	39
2.4.3	Diferencias entre LAMP y PCR	40
2.5	Métodos de extracción de ADN de hongos	41
2.5.1.	Métodos físicos	41
2.5.2.	Métodos químicos	41
2.5.3.	Métodos enzimáticos	42
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	43	
3.1	Ubicación del lugar de investigación	43
3.2	Recolección y transporte de muestras de excretas secas y húmedas	43
3.2.1	Materiales de trabajo	43
3.2.2	Materiales químicos.....	44
3.2.3	Procedimiento.....	44
3.3	Extracción de ADN total de las muestras de excretas secas y excretas húmedas de palomas	44
3.3.1	Materiales biológicos	44



3.3.2	Materiales químicos.....	45
3.3.3	Equipos e insumos.....	45
3.3.4	Procedimiento (Protocolo A) para la extracción del ADN de las muestras de excretas secas	45
3.3.5	Procedimiento (Protocolo B) para la extracción del ADN de las muestras de excretas secas	47
3.3.6	Procedimiento (Protocolo C) para la extracción del ADN de las muestras de excretas secas	47
3.3.7	Procedimiento (Protocolo D) para la extracción del ADN de las muestras de excretas secas	48
3.3.8	Procedimiento (Protocolo A) para la extracción del ADN de las muestras de excretas húmedas	48
3.3.9	Procedimiento (Protocolo B) para la extracción del ADN de las muestras de excretas húmedas	49
3.3.10	Procedimiento (Protocolo C) para la extracción del ADN de las muestras de excretas húmedas	49
3.3.11	Procedimiento (Protocolo D) para la extracción del ADN de las muestras de excretas húmedas	49
3.4	Obtención de cantidad y calidad del material genético de las muestras de excretas secas y húmedas con las cuatro modificaciones de los protocolos de extracción.....	50
3.4.1	Materiales biológicos	50
3.4.2	Materiales químicos.....	50
3.4.3	Equipos e insumos.....	50
3.4.4	Procedimiento.....	50
3.5	Obtención de la integridad del material genético de las muestras de excretas secas y húmedas con las cuatro modificaciones de los protocolos de extracción	51
3.5.1	Materiales biológicos	51
3.5.2	Materiales químicos.....	51
3.5.3	Equipos e insumos.....	51
3.5.4	Procedimiento	52
3.6	Obtención de la viabilidad del material genético de las muestras de excretas secas y húmedas con las cuatro modificaciones de los protocolos de extracción para ser amplificado mediante ensayos LAMP.....	53
3.6.1	Materiales biológicos	53



3.6.2 Materiales químicos o reactivos	53
3.6.3 Equipos e insumos.....	54
3.6.4 Procedimiento.....	55
3.7 Detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con bromuro de etidio.....	57
3.8 Extracción de material genético de sangre de paloma (<i>Columba livia</i>) para control de proceso positivo	57
3.9 Diseño experimental	57
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
4.1 Evaluación de la cantidad del material genético obtenido de las muestras de excretas secas y húmedas con las cuatro modificaciones de los protocolos de extracción	59
4.2 Evaluación de la calidad del material genético obtenido de las muestras de excretas secas y húmedas con las cuatro modificaciones de los protocolos de extracción.....	62
4.3 Evaluación de la integridad del material genético obtenido de las muestras de excretas secas y húmedas con las cuatro modificaciones de los protocolos de extracción.....	65
4.4 Evaluación de la viabilidad del material genético obtenido de las muestras de excretas secas y húmedas con las cuatro modificaciones de los protocolos de extracción.....	67
CAPITULO V: CONCLUSIONES	71
CAPITULO VI: RECOMENDACIONES	72
CAPITULO VII: BIBLIOGRAFÍA	73
CAPÍTULO VIII: ANEXOS	78



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Demostración de la cápsula de <i>C. neoformans</i> en frotis teñido con tinta India.....	24
Figura 2. Levadura de <i>H. capsulatum</i> dentro de los macrófagos	29
Figura 3. Disposición conidial de <i>Aspergillus</i>	34
Figura 4. Mapa de la zona urbana de la ciudad de Cuenca	43
Figura 5. Evaluación de la integridad del Protocolo B de las muestras de excretas húmedas	65
Figura 6. Evaluación de la viabilidad de material genético de palomas en excretas húmedas.....	67
Figura 7. Control de proceso en sangre de <i>Columba livia</i>	87
Figura 8. Evaluación de la integridad del Protocolo A de las muestras de excretas secas con ADN poco fragmentado.	88
Figura 9. Evaluación de la integridad del Protocolo B de las muestras de excretas secas.....	88
Figura 10. Evaluación de la integridad del Protocolo C de las muestras de excretas secas con ADN ausente.	89
Figura 11. Evaluación de la integridad del Protocolo D de las muestras de excretas secas con ADN ausente.	89
Figura 12. Evaluación de la integridad del Protocolo A de las muestras de excretas húmedas.....	90
Figura 13. Evaluación de la integridad del Protocolo C de las muestras de excretas húmedas.....	90
Figura 14. Evaluación de la integridad del Protocolo D de las muestras de excretas húmedas.....	91



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla Nº 1. Reactivos para el ensayo de amplificación LAMP.....	56
Tabla Nº 2. Tiempo y temperatura para la desnaturización y alineamiento ..	56
Tabla Nº 3. Concentración de Enzima Bsm ADN polimerasa.....	57
Tabla Nº 4. Tiempo y Temperatura de extensión e Inactivación	57
Tabla Nº 5. Coeficiente de varianza de la concentración de ADN total	60
Tabla Nº 6. Análisis de concentración de ADN total (ng/ul) por protocolo.....	60
Tabla Nº 7. Análisis de concentración de ADN total (ng/ul) por extracto	60
Tabla Nº 8. Análisis de concentración de ADN total (ng/ul) por interacción entre protocolo y extracto	61
Tabla Nº 9. Coeficiente de varianza de Ratio 260/280	62
Tabla Nº 10. Análisis del ratio 260/280 mediante la prueba de Duncan por protocolo	63
Tabla Nº 11. Análisis del ratio 260/280 mediante la prueba de Duncan por extracto	63
Tabla Nº 12. Análisis del ratio 260/280 mediante la prueba de Duncan por interacción entre protocolo y extracto	64
Tabla Nº 13. Frecuencias relativas al total (%) con relación al extracto	65
Tabla Nº 14. Frecuencias relativas al total (%), con relación al protocolo	66
Tabla Nº 15. Resultados obtenidos con excretas secas (ES).....	78
Tabla Nº 16. Resultados obtenidos con excretas húmedas (EH).	80
Tabla Nº 17. Reactivos para el ensayo de amplificación LAMP para el control positivo.....	85
Tabla Nº 18. Tiempo y temperatura para la desnaturización y alineamiento para el control positivo.....	86
Tabla Nº 19. Concentración de Enzima Bsm ADN polimerasa para el control positivo.....	86
Tabla Nº 20. Tiempo y temperatura para la extensión e inactivación del control positivo.....	86
Tabla Nº 21. Cuadro de Análisis de la varianza de la concentración (SC tipo III)	91
Tabla Nº 22. Cuadro de Análisis de la varianza de Ratio 260/280 (SC tipo III)	91
Tabla Nº 23. Chi Cuadrado Pearson de la interacción Protocolo-Integridad. ...	92
Tabla Nº 24. Chi Cuadrado Pearson de la interacción Extracto-Integridad.....	92



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Cuadros de resumen de resultados de la evaluación de cantidad, calidad e integridad de material genético con la aplicación de cuatro protocolos a excretas de palomas, evaluación de la viabilidad del ADN obtenido para material genético de palomas, hongos patógenos y <i>C. neoformans</i>	78
Anexo 2. Extracción de material genético de sangre de paloma (<i>Columba livia</i>) para control de proceso positivo	81
Anexo 3. Resultados de Integridad obtenidos con los cuatro protocolos con ES y EH.....	88
Anexo 4. Resultados obtenidos del ANOVA de concentración de ADN total y el ratio 260/280.....	91
Anexo 5. Resultados obtenidos de la prueba de Chi Cuadrado de Pearson en la interacción protocolo e integridad y extracto e integridad.	92
Anexo 6. Toma de muestras de excretas secas.....	92
Anexo 7. Toma de muestras de excretas húmedas.....	92
Anexo 8. ADN total obtenido de excretas secas.....	93
Anexo 9. ADN total obtenido de excretas húmedas.....	94



Cláusula de Propiedad Intelectual

Angélica Lucía Corte Pérez, autora del trabajo de titulación "**Protocolos de extracción de material genético de excretas de palomas (*Columba livia*) para la detección de hongos patógenos mediante ensayos LAMP**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 10 de marzo de 2021

Angélica Lucía Corte Pérez

C.I: 0104985023



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Angélica Lucía Corte Pérez en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **“Protocolos de extracción de material genético de excretas de palomas (*Columba livia*) para la detección de hongos patógenos mediante ensayos LAMP”**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 10 de marzo de 2021

Angélica Lucía Corte Pérez

C.I: 0104985023



Cláusula de Propiedad Intelectual

María Karina Sánchez Bueno, autora del trabajo de titulación "**Protocolos de extracción de material genético de excretas de palomas (*Columba livia*) para la detección de hongos patógenos mediante ensayos LAMP**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 10 de marzo de 2021

María Karina Sánchez Bueno

C.I: 0105587398



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

María Karina Sánchez Bueno en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Protocolos de extracción de material genético de excretas de palomas (*Columba livia*) para la detección de hongos patógenos mediante ensayos LAMP**", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 10 de marzo de 2021

María Karina Sánchez Bueno

C.I: 0105587398



DEDICATORIA

Karina

A Dios por guiar mi camino desde mi infancia, a toda mi familia por su amor y apoyo incondicional, a mi padre por ser un ejemplo de responsabilidad y disciplina, a mi madre por ser mi fuente de comprensión, sabiduría y cariño, los dos han sido los pilares fundamentales para mi formación, a mis hermanas porque son y serán siempre las mejores amigas que Dios me pudo regalar.

Angélica

A Dios por regalarme la dicha de la vida, a mi madre por ser la primera heroína de mi vida quien supo enseñarme valiosos valores y a salir adelante a pesar de las dificultades, a mi esposo e hijo quienes son el pilar y la razón fundamental para seguir en pie de lucha y a mis hermanos que me han brindado su apoyo incondicional en todo momento.



AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por este logro que nos ha permitido en nuestras vidas. Por sus bendiciones y por las personas que puso en nuestro camino para cumplir esta meta.

A nuestros padres por siempre confiar en nuestras capacidades y siempre brindarnos su ejemplo de constancia.

A la Dra. Silvana Méndez nuestra directora de tesis, que nos brindó siempre su tiempo y conocimientos.

Al Dr. Antonio Vallecillo por compartir sus conocimientos con paciencia, motivándonos a seguir investigando. Gracias por su tiempo y excelente labor docente.

Al Dr. Freddy Albarracín por su ayuda en la recolección de las muestras empleadas en este trabajo de investigación.

A los docentes de la Universidad de Cuenca, por todos sus conocimientos y experiencias compartidas durante toda nuestra formación académica.



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

BIP: Backward Inner Primer.

EH: Excretas Húmedas.

ES: Excretas Secas.

FIP: Forward Inner Primer.

F3: Forward Outer Primer.

B3: Backward Outer Primer.

FLP: Forward Loop Primer.

BLP: Backward Loop Primer.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

SDS: Dodecilsulfato Sódico.

NaCl: Cloruro de Sodio.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

LAMP: Loop-mediated isothermal amplification.

Kbp: Kilobase.

Col: Columba livia.

HoP: Hongos Patógenos.

Cneo: Cryptococcus neoformans.



CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos eucariotas responsables de varias enfermedades en plantas, animales y humanos. Existen alrededor de 5 millones de especies de hongos, de los cuales 600 especies causan enfermedades en animales y humanos, como infecciones superficiales en uñas y piel hasta las infecciones mucocutáneas e invasivas. Los casos reportados por infecciones micóticas se han incrementado en los últimos 30 años (1), causando un gran impacto en la salud pública y con ello se ha incrementado el riesgo de la pérdida de biodiversidad animal debido a la aparición de enfermedades inmunodepresoras y el crecimiento poblacional que favorece la dispersión de los hongos en el ser humano, animales y el medio ambiente. En humanos, las infecciones micóticas superficiales afectan a 1.7 billones de personas lo que representa el 25% de la población, mientras que las enfermedades micóticas invasivas son menos comunes, pero tienen una tasa de morbilidad y mortalidad significativa, causando la muerte de 1.5 millones de personas al año en todo el mundo. Más del 90% de estas muertes son causadas por hongos del género, *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* y *Pneumocystis* (1) .

La mayoría de las especies de hongos son oportunistas, un pequeño porcentaje son considerados patógenos primarios en humanos y animales. La aplicación de nuevas técnicas moleculares ha contribuido a la identificación y uso de nuevas terapias con antifúngicos.

La criptococosis, histoplasmosis y aspergilosis son micosis infecciosas profundas zoonóticas. Los agentes causales de estas micosis corresponden a las levaduras llamadas *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*), *Histoplasma capsulatum* (*H. capsulatum*) y *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*), las cuales son capaces de producir micotoxinas y son responsables de infecciones pulmonares, pueden desarrollarse hasta alcanzar una diseminación sistémica (2).



Existen estudios en diversos países que muestran que la paloma es uno de los principales reservorios de hongos patógenos, mismos que han sido aislados e identificados en sus excretas mediante técnicas de cultivo y biología molecular como PCR y LAMP. Sin embargo, en Ecuador no se ha reportado la aplicación de estas técnicas de biología molecular para la identificación de estos patógenos; por lo que, es importante estudiarlos debido a la capacidad zoonótica que poseen estos hongos y el impacto sanitario en los animales, la variedad de lugares en los que se encuentran y sobre todo porque afectan en gran medida a las personas inmunodeprimidas en las que puede causar incluso la muerte.

Las herramientas de biología molecular permiten diagnosticar la presencia de hongos patógenos en tejidos animales, vegetales, excretas de aves, etc. Si bien el cultivo es el método diagnóstico más eficiente y confiable; sin embargo, la probabilidad de adquirir la infección en el laboratorio es elevada al momento de realizar esta técnica microbiológica, por lo que para identificarlos se necesitan laboratorios con bioseguridad nivel 3, esta situación ha hecho que en la actualidad en nuestro país sea un problema por la inexistencia de laboratorios con un riguroso nivel de bioseguridad que realicen pruebas para diagnosticar patógenos potencialmente peligrosos para la salud pública debido a que pueden generar enfermedades como la aspergilosis, histoplasmosis y criptococosis. El ensayo LAMP y PCR son una alternativa de diagnóstico; sin embargo, en ambos casos se ven afectados por la eficiencia del procedimiento de extracción de material genético, por lo que es fundamental implementar un protocolo de extracción de ADN de hongos patógenos y aplicar una técnica diagnóstica que nos permita identificar la presencia de éstos en excretas de palomas que se encuentran en las zonas urbanas de la ciudad de Cuenca, para de esta forma tener una herramienta diagnóstica que sirva para analizar el estado sanitario de las palomas y determinar el riesgo zoonótico que representa para los humanos y animales para basados en estos resultados tomar decisiones en el manejo poblacional de estas aves.

Existen varias técnicas que se fundamentan en el tratamiento físico, químico y biológico que permiten la liberación del ADN para su posterior purificación. Por



este motivo la presente investigación se centró en evaluar la aplicación de varios protocolos de extracción de ADN, parte fundamental para identificar hongos patógenos en excretas de palomas, y adicionalmente implementar la técnica de LAMP para detectar material genético de los mismos, ya que por sus características de alta sensibilidad y especificidad analítica nos ayudará a identificar directamente a estos patógenos.



1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Evaluar la aplicación de protocolos de extracción de material genético de excretas de palomas (*Columba livia*) para la detección de hongos patógenos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar la cantidad, calidad e integridad de material genético extraído mediante la aplicación de cuatro versiones de protocolos a excretas de palomas.
- Determinar la viabilidad del ADN obtenido con los protocolos de extracción aplicados a las excretas de palomas, para ser amplificado mediante un ensayo LAMP que permite la detección de material genético de las propias aves.
- Determinar la viabilidad del ADN obtenido con los protocolos de extracción aplicados a las excretas de palomas, para la detección de ADN de hongos patógenos y de ADN de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* potencialmente presentes en excretas de palomas.

1.2 Hipótesis

¿Es posible extraer material genético de excretas de palomas para evidenciar la presencia de hongos patógenos, entre ellos *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*?



CAPITULO II: REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 **Columba livia**

La capacidad de adaptación de las palomas ha permitido que esta especie represente un desequilibrio para el ecosistema de un país. Un número elevado de palomas y su estado de salud variable hace que se transformen en plagas urbanas y una gran fracción de la población sea capaz de transmitir enfermedades, contaminar el agua, alimentos y dañar la arquitectura de la ciudad, ocasionando pérdidas económicas (3).

Las palomas son portadoras de varias enfermedades como la histoplasmosis, clamidiosis, salmonelosis, colibacilosis, criptococosis, aspergilosis, alveolitis alérgica, neumoencefalitis, tripanosomiasis y tuberculosis (4).

2.2 **Hongos**

2.2.1 **Generalidades**

Los hongos son eucariotas, presentan núcleo y membrana celular, retículo endoplásmico, mitocondrias y aparato secretor. Muchos son aerobios obligados o facultativos. Son quimiótrofos secretores de enzimas que degradan una amplia variedad de sustratos orgánicos. Además son unicelulares como las levaduras o pluricelulares como las hifas, de paredes rígidas por la presencia de quitina, son heterótrofos no poseen clorofila, se reproducen sexual y asexualmente y producen estructuras reproductivas denominadas esporas y conidios (5).

Los hongos no tienen la capacidad de formar tejidos, sin embargo, pueden vivir en diferentes ambientes como: tierra, agua o incluso aire. Las condiciones para su desarrollo en el medio ambiente se basa en las variables fisicoquímicas como: humedad, temperatura, altitud, luz, aireación, pH, hidratos de carbono, etc. (6). Su función principal en la naturaleza es la de degradar organismos muertos, por lo que son considerados saprófitos, también pueden ser organismos simbióticos que viven en asociación y por último están los que son considerados parásitos,



por alimentarse de sustancias que elabora otro ser vivo como los humanos, al habitar sus órganos puede causar daños o enfermedad (5).

En los últimos años la aparición del SIDA, el aumento de los trasplantes de órganos, el incremento de enfermedades metabólicas, entre otras variables, ha producido el aumento de micosis, puesto que, cuando un hospedador está inmunosuprimido, los hongos pueden colonizarlo y producir una patología (6).

2.2.2 Mecanismos patogénicos

Los hongos presentes en el ambiente pueden ser inhalados para luego colonizar órganos diana, también pueden ser inoculados en la piel por algún traumatismo, otros provocan infecciones en personas con mecanismos de defensa suprimidos generando las micosis oportunistas. También están los hongos simbióticos del humano que se transforman en oportunistas bajo ciertas condiciones de inmunosupresión como la candidiasis y por último tenemos a los dermatofitos antropofílicos estrictos, patógenos del humano que se transmite por contacto directo de persona a persona o indirecto mediante fómites (6).

Los hongos son capaces de parasitar a los humanos por varias características, son termotolerantes a 37°C; poseen ciertas adaptabilidades bioquímicas (producir enzimas específicas, vivir en condiciones de bajo nivel de O₂, adaptar su pH, producir melanina); tienen adaptabilidad morfológica (los hongos dimorfos y bifásicos); tienen capacidad de adherencia a las membranas o epitelios; pueden penetrar en los tejidos, originando pseudohifas (como las levaduras de *Candida albicans*), y multiplicarse en ellos; y burlar los mecanismos de defensa (como la producción de cápsula del *Cryptococcus neoformans var. neoformans*) para evitar su fagocitación (6).



2.3 Hongos oportunistas

2.3.1 *Cryptococcus neoformans*

Hace poco más de 100 años, *C. neoformans* fue identificado por primera vez en jugo de melocotón y después se aisló el primer caso clínico de la infección de este hongo patógeno en una lesión tibial en una joven mujer alemana (7). En 1951 Emmons fue quien reportó la presencia de este hongo en las excretas de paloma y suelos, concluyendo que la exposición de hombres y animales a las excretas de paloma y suelos contaminados predisponen las trasmisión del hongo (8). Esta levadura causa desórdenes nerviosos más comúnmente en perros y gatos, y es menos común en caballos, vacas, cabras, ovejas y llamas (2).

2.3.1.1 Morfología

El ciclo de vida de *C. neoformans* se divide en dos fases, vegetativa y sexual. La fase sexual (teleomorfo) se conoce como *Filobasidiella neoformans*. Existen dos formas morfológicas principales en la fase de crecimiento vegetativo. La forma predominante que se encuentra en el medio ambiente y en los hospedadores animales es la levadura de gemación unicelular. Las células de levadura son de paredes delgadas, esféricas a ovales con un diámetro muy variable (2–20 µm) y se reproducen por división mitótica. La otra forma vegetativa son las seudohifas, producidas por células de levadura unidas debido a la separación incompleta después de la división mitótica. No se consideran hongos dimórficos debido a su existencia como levadura en el medio ambiente y los huéspedes, además tanto a 25 como a 37 ° C, pueden producir colonias similares a levaduras en los medios de aislamiento (2).

Una característica morfológica única de *C. neoformans* es la presencia de una cápsula, la cual se puede observar en preparaciones frescas mediante tinción con tinta india diluida o microscopía de contraste de fase. La tinción de Giemsa también puede teñir parcialmente la cápsula, consta principalmente de dos polisacáridos, glucuronoxilomanano (GXM) y glucuronoxilomanogalactano (GXMGal), junto con cantidades más pequeñas de manoproteínas (2).

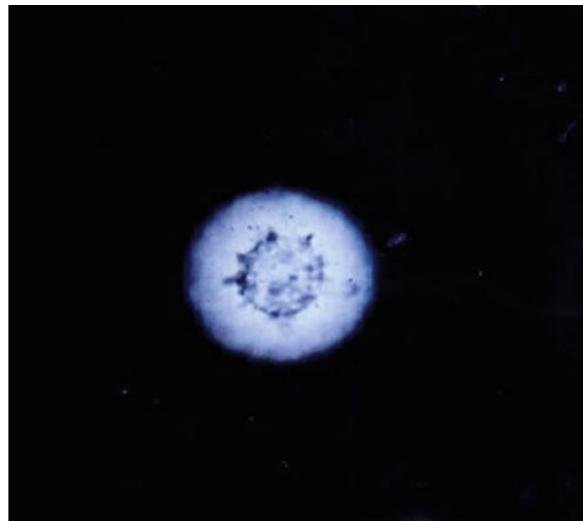


Figura 1. Demostración de la cápsula de *C. neoformans* en frotis teñido con tinta India (2).

2.3.1.2 Clasificación y reproducción

El microorganismo tiene la siguiente clasificación filogenética:

Dominio: *Eukarya*

Reino: *Fungi*

Filum: *Basidiomycota*

Subfilum: *Agaricomycotina*

Clase: *Tremellomycetes*

Orden: *Tremellales*

Familia: *Tremellaceae*

A partir del género y la especie diverge la nomenclatura según el estado en el que se encuentren, *Filobasidiella neoformans* (teleomorfo/estado sexual), *C. neoformans* (anamorfo/estado asexual), *Filobasidiella bacillispora* (teleomorfo/estado sexual), *C. gattii* (anamorfo/estado asexual) (9).

En el *C. neoformans* la reproducción puede ser sexual o asexual (10). No es común su reproducción en la naturaleza o dentro del huésped, puesto que ciertos factores como la temperatura 37°C, la alta humedad y el 5% de dióxido de carbono pueden inhibir el apareamiento dentro de un huésped. En el laboratorio, los estimulantes específicos (mioinositol, ácido indol acético, iones de cobre y falta de nitrógeno) pueden inducir el apareamiento. Las heces de paloma



también pueden favorecer el apareamiento de *C. neoformans* var. *neoformans*. Durante el apareamiento bisexual (sexo opuesto), las células de levadura compatibles se fusionan para producir una hifa que contiene dos núcleos parentales, mientras que el apareamiento unisexual o haploide implica la fusión entre dos células haploides generando hifas, basidios y esporas (2).

2.3.1.3 Susceptibilidad a los desinfectantes y antifúngicos

La replicación de *C. neoformans* se detiene por encima de 40°C. El pH alcalino es perjudicial para la levadura. Entre los desinfectantes químicos, *C. neoformans* es susceptible a hipoclorito de sodio al 1%, yodo, fenol, glutaraldehído y formaldehído (2).

Los aislamientos de *C. neoformans* muestran una susceptibilidad ligeramente menor hacia fluconazol, y son sensibles a amfotericina B e itraconazole (11). Todas las cepas de *Cryptococcus* son resistentes a caspofungina (12).

2.3.1.4 Hábitat natural

C. neoformans presenta una distribución mundial, aislándose habitualmente de las excreciones de palomas y otras aves como loros, gorriones y bosques en descomposición (4). La excreta de paloma es un ambiente favorable rico en creatina, urea y ácido úrico que actúan como fuente principal de nitrógeno para los hongos ayudando al crecimiento de *C. neoformans* (13). El organismo también ha sido aislado del aire, agua, ruedas de automóviles y calzado. Las levaduras pueden mantenerse viables en los excrementos de palomas por años si están protegidas de los rayos de sol (14). Pueden sobrevivir durante 20 años o más en excrementos secos de palomas en lugares oscuros y húmedos, se estima que 1 g de excremento de paloma seca puede contener hasta 50 millones de células viables de *C. neoformans* (15). Son mucho más resistentes a la desecación que las células de otras levaduras (16).



2.3.1.5 Aislamiento, crecimiento y características de la colonia

El cultivo de la levadura se realiza en agar sabouraud dextrosa con antibióticos como el cloranfenicol, no debe usarse la cicloheximida porque inhibe algunas cepas del hongo. La temperatura óptima para su crecimiento es de 37°C, aunque también crecen a 25°C. Produce colonias lisas de textura mucoide y coloración blanco cremosa; se desarrolla bien en medios bacteriológicos generales como agar sangre y medios líquidos para hemocultivos (2). Para muestras contaminadas como las provenientes de vías respiratorias o muestras ambientales se usan medios especiales selectivos como son el medio de *guizotia abyssinica* (niger), también conocido como medio staib, el ácido cafeico o por la acción de fenilalanina-amino liasa (PAL) que usa un extracto acuoso de semillas de girasol (*Helianthus annuus*). En estos medios *C. neoformans* sintetiza la enzima fenoloxidasa que cataliza la oxidación de unos sustratos difenólicos en productos similares a la melanina. En estos medios las colonias se observan de un color pardo que permiten diferenciarlas de otras levaduras como las cándidas u otras especies de *Cryptococcus* (17).

2.3.1.6 Transmisión

La infección criptococólica se adquiere por inhalación; sin embargo, también puede producirse por inoculación directa o heridas en la piel(18). Las basidiosporas, producidas por la reproducción sexual, son partículas infecciosas importantes, de tamaño pequeño (2–3 µm) que pueden invadir fácilmente los alveolos pulmonares. Los niños a menudo están expuestos a *C. neoformans* antes de la edad de 5 años. En adultos también son comunes los anticuerpos contra *Cryptococcus*. En los huéspedes inmunocompetentes, el hongo se elimina o queda inactivo, mientras que, en los huéspedes inmunocomprometidos, se propaga a otros órganos con consecuencias fatales. Sin embargo, la transmisión de humano a humano no se registra, y parece que los humanos y animales son el huésped sin salida de donde las células pueden reciclarse en la naturaleza (2).



2.3.1.7 Patogénesis

Las esporas se alojan en los alveolos pulmonares de los animales o humanos después de la inhalación. Inicialmente, la infección es asintomática y latente. La latencia de las células de la levadura está asociada con varios mecanismos de evasión adaptativos e inmunes, por ejemplo, la cápsula que poseen estos hongos ayuda en la evasión del sistema inmune y la supervivencia dentro del huésped, evitando la unión de anticuerpos con las levaduras (2).

Además, *C. neoformans* puede modular la respuesta inmune adaptativa de varias maneras, como la inhibición de la activación de las células T y la inducción de la apoptosis de las células T, la interferencia con la maduración de las células dendríticas y la interferencia con la función del anticuerpo (2).

Las manifestaciones clínicas incluyen síntomas que están presentes por semanas, hay dolor de cabeza con o sin rigidez de cuello, fiebre de origen desconocido, somnolencia y alteración en el sensorio con progreso de la enfermedad, meningitis crónica, en ocasiones puede resultar en un granuloma criptococósico cerebral (19). El cerebelo humano o animal es una fuente rica de inositol que mantiene las respuestas neurológicas normales. *C. neoformans* puede usar el inositol como única fuente de carbono lo que explica su afinidad por el cerebro. La penetración de la barrera es crucial para el desarrollo de meningitis, el "mecanismo del caballo de Troya" a través de los macrófagos infectados u otros fagocitos es utilizado por las levaduras para penetrar la barrera hematoencefálica (2).

Además, pueden presentarse otros afecciones como pérdida visual rápida o lenta, lesiones óseas osteolíticas, criptococosis cutánea secundaria, criptocococemia y criptococciuria conocida como criptococosis diseminada, recientemente pocos casos de peritonitis criptococósica han sido también reportados (19).

Cryptococcosis pulmonar, regularmente asintomática, es decir no se produce la enfermedad porque el sistema inmune puede controlar la infección, pero cuando



es sintomática los pacientes tienen neumonitis autolimitada, fiebre leve, efusión pleural (poco común), adenopatía hilar y calcificación; sin embargo en personas con VIH, enfermedades linfoproliferativas, trasplante de órganos, pacientes que reciben corticoides el riesgo de contraer el hongo es mayor, además es capaz de causar la muerte en estos pacientes (19).

2.3.1.8 Diagnóstico

Para el diagnóstico de *C. neoformans*, se pueden tomar muestras como hisopos nasales, muestras de tejido recolectadas por aspiración con aguja fina, sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), orina, líquidos pleurales y abdominales, leche mastítica y ganglios linfáticos, piel, pulmón y médula ósea (post mortem) (2).

El hongo puede ser observado en preparaciones en fresco mediante montaje con tinta china diluida en solución salina o a la observación en microscopio con contraste de fase. Con esta preparación se observa la presencia de células esféricas, rodeadas por un gran halo claro que corresponde a la cápsula (17).

2.3.2 *Histoplasma capsulatum*

El *H. capsulatum* es un hongo dimórfico intracelular que causa una severa infección pulmonar y sistémica en humanos y animales. Aunque diferentes publicaciones sugieren la existencia del hongo *H. capsulatum* desde la antigüedad, quien observó y describió por primera vez al hongo, fue el doctor Samuel T. Darling en el año 1906. En 1909, Darling describe a la histoplasmosis como una enfermedad infecciosa severa, la cual se caracteriza por la presencia de esplenomegalia, emaciación, fiebre, leucopenia, anemia e invasión del endotelio celular por el agente causal en humanos y animales (20).

2.3.2.1 Morfología

H. capsulatum es un hongo térmicamente dimorfo, que exhibe dos diferentes formas, la de levadura y la de moho en dos tipos de temperatura. La levadura patógena se observa dentro del tejido del huésped (37°C), mientras que la forma invasiva del moho prevalece en el medio ambiente (25-30°C). En los tejidos infectados, las células de la levadura se observan ovales dentro de los macrófagos, con un diámetro de 3–5 µm. Su pared celular no permite el paso de



la tinción de Gram o tinción de Giemsa. Raramente se encuentran en condición extracelular (2).

El carbohidrato es el componente principal (80%) de la pared celular. La glucosa (Glc), manosa (Man) y galactosa (Gal) son los monosacáridos más abundantes en la pared celular de *H. capsulatum*. El glucano (Glc) y la N-acetilglucosamina persisten como un polímero (enlace β -1,4) conocido como quitina. El α -glucano está asociado con la multiplicación de la levadura dentro de los macrófagos, mantenimiento de la levadura dentro del fagolisosoma y bloqueo del reconocimiento inmune innato por los receptores (2).

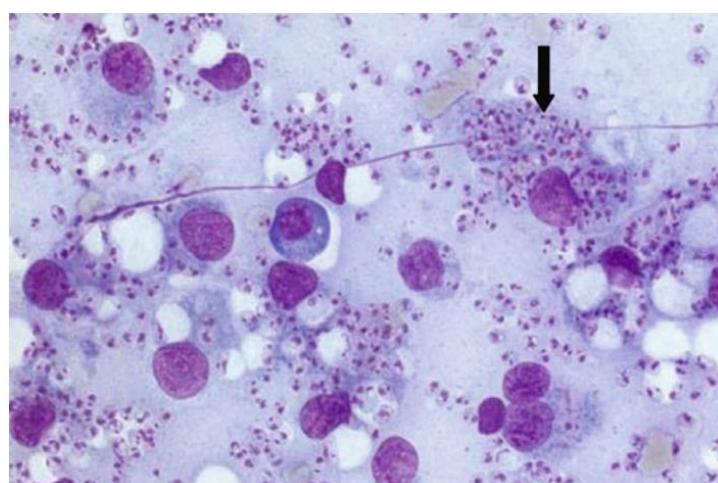


Figura 2. Levadura de *H. capsulatum* dentro de los macrófagos (2).

2.3.2.2 Clasificación y reproducción

El ciclo sexual comienza con la fusión de dos hifas o dos levaduras para formar una estructura en forma de saco denominada asca. En su interior se desarrollan cuatro u ocho ascosporas que al liberarse originan una nueva colonia, levaduriforme. En el ciclo asexual se reproducen mediante gemación (21). En el humano la fase de levadura se desarrolla en el interior de las células del sistema macrofágico mononuclear, caracterizándose por el desarrollo de levaduras ovales y gemantes. La fase micelial se encuentra en la tierra o en cultivos obtenidos de muestras de heces de palomas (22).



El microorganismo tiene la siguiente clasificación filogenética:

Reino: *Fungi*

Subreino: *Dikarya*

Filum: *Ascomycota*

Clase: *Euscomycetes*

Orden: *Onygenales*

Familia: *Onygenaceae*

Género: *Histoplasma*

Especie: *Histoplasma capsulatum* (23).

2.3.2.3 Susceptibilidad a los desinfectantes

H. capsulatum es susceptible a la solución de hipoclorito de sodio al 1%, fenol al 2%, glutaraldehído al 2% y la formalina al 3%. Dentro de los antifúngicos que son efectivos contra este hongo tenemos la anfotericina B, el ketoconazol y el itraconazol las cepas de *H. capsulatum* se inhiben a concentraciones bajas, y ante el fluconazol se inhibe a concentraciones altas. Las esporas de la levadura se pueden destruir mediante la exposición a una temperatura de 40°C por un tiempo prolongado (24).

2.3.2.4 Hábitat Natural

Puede crecer en diferentes tipos de suelo, están presentes a pocos centímetros de la superficie del suelo. Se requiere un clima húmedo, una temperatura que varía de 25 a 35°C y un pH neutro a alcalino para su crecimiento óptimo. La oscuridad favorece la esporulación. Los excrementos de aves y el guano de murciélago pueden enriquecer su crecimiento con suplementos de nitrógeno. Especialmente el guano de murciélago que se encuentra en lugares cerrados, como grutas, cuevas, minas y edificios abandonados, actúa como una fuente importante de infección. La mayoría de los brotes humanos ocurren cuando se perturban lugares antiguos de descanso de las aves o cuando se visitan cuevas habitadas por murciélagos (2).

Afecta a más de 60 países; sin embargo, su incidencia es más alta en América (8). Desde el punto de vista epidemiológico, son áreas endémicas de la



enfermedad Asia, Japón, el litoral Mediterráneo y América (23). Dos variedades son reconocidas en enfermedades humanas: *var. capsulatum* y *var. duboisii* (el tipo africano). *H. capsulatum* *var. duboisii* causa enfermedad restringida a África y Madagascar y la *var. capsulatum* tiene una distribución mundial (19).

2.3.2.5 Aislamiento y crecimiento

H. capsulatum puede aislarse en agar sabouraud dextrosa enriquecido con glicerol al 2.5%. Se recomienda la adición de antibióticos como la cicloheximida (0.5 g/l) y cloranfenicol (0.5 g/l) para prevenir el crecimiento de bacterias contaminantes. Las placas se mantienen a temperatura ambiente (25–30°C) durante 2–8 semanas. Para la fase de levadura, el subcultivo de micelio se puede realizar en agar de infusión de cerebro y corazón que contiene 5% de sangre de caballo a 35–37°C con 5% de tensión de CO₂ y alta humedad (2).

Las colonias de la levadura son pequeñas, grises, escamosas, compuestas de algunas hifas. *H. capsulatum* *var. capsulatum* produce colonias planas, elevadas, arrugadas y de color blanco a marrón grisáceo que a menudo vuelven a su fase micelial estable (2).

2.3.2.6 Transmisión

H. capsulatum es principalmente transmitido por inhalación, ingestión y raramente por contaminación de heridas. En las áreas donde aves o murciélagos habitan pueden superar las 10⁵ partículas por gramo de suelo. Las personas que trabajan como granjeros, jardineros, avicultores y exploradores de cuevas corren un alto riesgo de contaminación (2).

2.3.2.7 Patogénesis

La infección comienza con el ingreso de las microconidias por vía aerógena. Independiente de la vía de ingreso de las microconidias, el destino final es el alvéolo pulmonar, donde son atacadas por los macrófagos tisulares. Es en esta etapa donde las microconidias pasan a la fase levaduriforme es la forma



patógena debido a que la multiplicación del material patógeno se produce al interior de los macrófagos desencadenándose la lisis del mismo (23).

Los pacientes que por diversas causas presentan un sistema inmunitario deprimido, el cual se ve sobrepasado por una dosis infectante del agente, el hongo avanza por vía hemática o por el sistema retículoendotelial hacia los nódulos regionales. La diseminación hemática es generalmente asintomática. Dependiendo de la cantidad de esporas y de la inmunocompetencia del individuo afectado se pueden presentar infección leve con fiebre, fatiga, tos y dolor torácico o casos de infección sintomática con compromiso pulmonar severo y enfermedad diseminada. Algunas veces las levaduras permanecen latentes en el huésped durante toda su vida y se rejuvenecen para producir enfermedades durante el deterioro de la inmunidad del huésped (25).

2.3.2.8 Diagnóstico

Para la detección de *H. capsulatum* se pueden recolectar muestras de orina, sangre, lavado broncoalveolar (pacientes con neumonía), líquido cefalorraquídeo (pacientes con meningitis) y aspirados de médula ósea de pacientes humanos. En pacientes caninos se puede realizar aspirado pulmonar, lavados gástricos, tomar muestras de sangre periférica, heces, médula ósea esternal, biopsias del hígado, bazo o ganglios linfáticos (2).

Para microscopía directa de frotis de muestras o secciones de tejido, la rutina de hidróxido de potasio (KOH) al 10% o las tinciones de hematoxilina y eosina generalmente no permiten la visualización de levaduras diminutas. La sección debe estar pintada con metenamina plata o colorante PAS (Ácido Peryódico de Schiff) para visualizar mejor *H. capsulatum*. Distintivo 2-4 µm, ovalado, en ciernes de base estrecha levaduras dentro de macrófagos, pero también se ven libres en secciones de tejido, que permite el diagnóstico tentativo de la histoplasmosis (19).



2.3.3 *Aspergillus fumigatus*

A. fumigatus fue descrito por primera vez en 1729 por P.A. Micheli, quien comprobó que la cabeza conidial de este hongo se parecía a un aspergilum que es un instrumento utilizado para dispersar agua bendita. En 1749, Reaumur describió por primera vez las aspergillosis en aves (26). Las aflatoxinas fueron descubiertas en 1961 durante la investigación de una enfermedad misteriosa en los pavos que causó alta mortalidad, mientras que en 1996 se hizo el primer reporte de micosis gutural en caballos (2).

2.3.3.1 Morfología

El micelio está compuesto por hifas septadas con ramificación. La rama primaria que se origina de la hifa vegetativa se conoce como célula del pie que se ramifica aún más en los conidióforos. Los conidióforos contienen vesículas en forma de matraz, de 20–30 µm de diámetro. La mitad distal de la vesícula está cubierta con una única serie de fialida, de 6–8 µm de longitud, dispuesta hacia arriba paralelamente al eje del conidióforo. De estos fialidos, se originan las cadenas de conidias (esporas asexuales). En los tejidos solo se observa micelio, y en las cavidades del cuerpo llenas de aire (saco de aire, paso nasal) se encuentran los conidióforos con los fialidos. En *A. fumigatus*, la pared celular está compuesta de β - (1, 3) glucano, β - (1, 3 / 1,4) glucano, β - (1, 6) glucano, α (1, 3) glucano, quitina, manano, β - (1, 5) galactofuranosa, galactomanano (GM) y galactomanoproteína. Estos componentes están reticulados con otras proteínas (2).

A veces fuera de la pared celular se encuentra una capa hidrófoba tanto en las hifas como en los conidios. Los conidios o esporas asexuales están pigmentados, además de la capa hidrófoba fuera de la pared celular, los conidios también contienen una capa de melanina. Los conidios se producen en grandes cantidades y, debido a su pequeño tamaño (2–3 µm) e hidrofobicidad pueden permanecer viables en el aire durante un período prolongado. La concentración media de conidios de *Aspergillus* en el aire es de 0.2 a 15 conidios / m³ y es de hasta 106 conidios / m³ en algunos entornos agrícolas. En el ambiente favorable, los conidios pueden hincharse y germinar en las hifas. La mayoría de los



Aspergillus no tiene ningún etapa sexual del crecimiento (hongos imperfectos) excepto *A. fumigatus*, *A. oryzae* y *A. nidulans* que pueden producir esporas sexuales (ascosporas) (2).

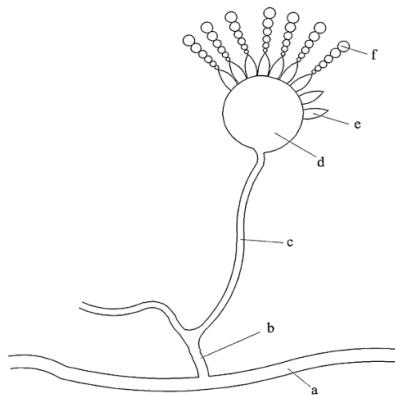


Figura 3. Disposición conidial de *Aspergillus*. a Hifa, b célula del pie, c conidióforos, d vesícula, e fiálida, f conidios (2).

2.3.3.2 Clasificación y reproducción

Se conocen unas 900 especies del género *Aspergillus*, Rapper y Fennell clasifican en 18 grupos, de los que 12 se relacionan con enfermedades humanas como el *A. fumigatus* (85%), *A. flavus* (5-10%), *A. niger* (2-3%), *A. terreus* (2-3%), *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. clavatus*, *A. cervinus*, *A. candidus*, *A. flavipes* y *A. ustus*. Para clasificarlos hay que tener en cuenta el tamaño, forma de las cabezas conidiales, morfología de los conidióforos, fiálides y métrulas (26).

Puede tener reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de ascas) y asexual (con formación de conidios). Las colonias crecen a 37°C lo que le hace idóneo para afectar al humano, son planas, compactas y con un aspecto aterciopelado y color blanquecino que cambia a verde azulado o verde grisáceo (27).

El microorganismo tiene la siguiente clasificación filogenética:

Reino: *Fungi*

Filum: *Ascomycota*

Clase: *Ascomycetes*

Orden: *Eurotiales*

Familia: *Trichocomaceae*



Género: *Aspergillus*

Especie: *Aspergillus fumigatus* (27).

2.3.3.3 Susceptibilidad a los desinfectantes

A. fumigatus es susceptible a desinfectantes como el glutaraldehído al 0,5%, hipoclorito sódico, sulfato de cobre y etanol al 35%. También se inactivan los conidios mediante la irradiación con microondas a 800 vatios en un tiempo de 90 segundos a 120 segundos o con un tratamiento de calor de 60°C durante 45 minutos. Los antimicóticos como el voriconazol y la anfotericina B son buenos para inactivar el *Aspergillus*; sin embargo, algunas cepas son resistentes a los mismos (27).

2.3.3.4 Hábitat natural y distribución

Es un hongo filamentoso ambiental que posee una distribución mundial, que se desarrollan comúnmente en tierra, aire, agua, sobre materia orgánica en descomposición, produciendo conidios que se aerolizan fácilmente (28). Es un hongo saprófito que obtiene su energía del suelo, restos de plantas, madera en descomposición, forraje animal, insectos muertos, granos almacenados, incluso de humanos y animales. Después del establecimiento de la infección en un huésped susceptible, se producen las aflatoxinas. Esporula abundantemente, produciendo miles de conidios que tienen un diámetro de 2 a 3 mm (24). Es termotolerante, puede vivir entre los 12 y 57°C, las esporas pueden sobrevivir a 70°C (27).

2.3.3.5 Aislamiento y crecimiento

El cultivo de este hongo se realiza en agar sabouraud dextrosa con o sin cloranfenicol (0,05g/L) y otro medio común como el agar sangre. Se incuba a 37°C por 4-5 días examinándolo constantemente para detectar signos de contaminación. Algunas especies como el *A. fumigatus* son termófilas lo que indica que pueden crecer a 55-75°C. Para la identificación se observa la morfología de los conidios y conidióforos, se caracteriza por tener conidios



verdes, de 2.5 a 3 mm de diámetro. Algunos aislamientos de *A. fumigatus* son sin pigmento y producen conidias blancas (29).

2.3.3.6 Transmisión

Las encuestas ambientales indican que todos los humanos inhalan varios cientos de conidios de *A. fumigatus* por día, los que son eliminados si el sistema inmune es competente; sin embargo, debido al aumento de pacientes inmunodeprimidos en los últimos 10 años, *A. fumigatus* se ha convertido en el hongo aerotransportado más prevalente, causante de infecciones invasivas severas y generalmente fatales (29). Sus factores de patogenicidad incluyen: tamaño pequeño de sus conidias que permite que sean aspiradas y que puede causar infección en el pulmón y en los senos paranasales; gran capacidad de adherencia a los vasos endoteliales y superficies epiteliales lo que conlleva a infectar los vasos sanguíneos, y producir sustancias extracelulares tóxicas para las células de los mamíferos (28); también se transmite por contaminación de heridas o mucosas. La inhalación de polvo contaminado o la ingestión de alimento contaminado con esporas de hongos es la principal ruta de transmisión en animales y aves (27).

En los animales principalmente en las granjas de aves las esporas son introducidas con la comida o con la bandada; un ambiente húmedo con poca ventilación, ausencia de sanitización, mal almacenamiento de los alimentos permite que las esporas se multipliquen más rápido y se transmitan a las aves, además el estrés por mal manejo de las aves deprime el sistema inmune de las mismas lo que predispone la diseminación del hongo (2).

2.3.3.7 Patogenicidad

Causa infecciones locales y superficiales como otomicosis, onicomicosis, queratitis, además posee efectos alérgicos que generan asma, rinitis y alveolitis (27). En individuos inmunodeprimidos se puede desarrollar la aspergilosis pulmonar invasiva, produciendo fiebre, disnea, tos, dolor en el pecho, hemoptisis, infiltrados pulmonares, hemorragia bronquial. Al realizar una radiografía de tórax se puede ver la atelectasia segmentaria o lobar (19).



La aspergilosis extrapulmonar se puede presentar como abscesos focales o hemorrágicos o aneurismas micóticos, en casos raros puede presentarse como déficit neurológico. En casos especiales puede existir endocarditis, miocarditis, esofagitis, linfadenitis, abscesos en la piel, hígado, bazo, riñón o páncreas (19).

En los animales como las aves, los sacos aéreos son los primeros órganos que entran en contacto con el hongo, luego pasa al parénquima pulmonar donde se enfrenta a varios mecanismos de defensa, los macrófagos lo reconocen y eliminan el hongo. En animales inmunodeprimidos los hongos pueden burlar a los macrófagos y establecerse para la germinación, destrucción de células del hospedero para la obtención de nutrientes, adaptación al medio y producción de toxinas lo que permite la angioinvasion, trombosis e infartación creando un foco necrótico donde el hongo puede crecer (2).

2.3.3.8 Diagnóstico

Se pueden tomar muestras de pacientes humanos del tracto respiratorio inferior por lavado broncoalveolar, también se recolectan muestra post mortem del pulmón y nódulos de órganos vitales. Las pequeñas muestras de tejido se envuelven en papel antes de ponerlas en formalina al 10%. Las muestras clínicas de animales o aves de corral incluyen leche mastítica, contenido estomacal fetal, hisopos de oídos, raspado de piel y biopsias de granuloma nasal y placas en la bolsa gutural (2).

Las muestras clínicas, deben ser tratadas con 10% de KOH y observarse bajo el microscopio. Además se puede realizar la tinción histopatológica con ácido peryódico Schiff (PAS), plata de Grocott o tinción de plata con metanamina para detectar la invasión de tejidos (19).



2.4 Ensayos Moleculares

2.4.1. Características de los ensayos

2.4.1.1 LAMP

La amplificación isotérmica mediada por un lazo (LAMP) es un método útil de detección de ADN con alta especificidad y sensibilidad. La reacción LAMP se lleva a cabo en poco tiempo a una temperatura constante sin necesidad de ciclos térmicos. El método LAMP debería ser un medio útil para detectar hongos en ambientes interiores, áreas de desastre, o incluso en naves espaciales tripuladas para prevenir alergias o infecciones causadas por hongos (29).

La tecnología LAMP amplifica el ADN con una alta sensibilidad que se basa en una enzima con actividad de desplazamiento de hebra en condiciones isotérmicas. Además, la tecnología utiliza de cuatro a seis cebadores especialmente diseñados que reconocen de seis a ocho regiones de la secuencia de ADN objetivo, por lo que tiene una alta especificidad (30).

Las reacciones de ciclado automático conducen a la acumulación de una gran cantidad de ADN objetivo y otros subproductos de reacción, como el Pirofosfato de Magnesio, que permiten la detección rápida utilizando diversos formatos (30).

Un cebador interno que contiene secuencias de las cadenas sentido y antisentido del ADN diana inicia LAMP. La siguiente síntesis de ADN en el desplazamiento de la cadena, impregnada por un cebador externo, libera un ADN de una sola cadena. Esto sirve como plantilla para la síntesis de ADN marcada por los segundos cebadores internos y externos que hibridan con el otro extremo del objetivo, lo que produce una estructura de ADN de tallo-bucle. En el ciclo posterior de LAMP, un cebador interno hibrida con el bucle del producto e inicia la síntesis de ADN de desplazamiento, produciendo el ADN de tallo-bucle original y un ADN de tallo-bucle nuevo con un tallo el doble de largo (31).



2.4.1.2 PCR

PCR es el proceso por el cual se lleva a cabo la amplificación in vitro del ADN, haciendo millones de copias. El ADN amplificado se hace visible bajo luz ultravioleta. El proceso es altamente sensible, específico y requiere menos tiempo y poca experiencia. La detección de ácidos nucleicos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha tenido un gran impacto en el diagnóstico microbiológico. La mayoría de las técnicas en uso han sido diseñadas para la detección específica de un microorganismo. Sin embargo, también es posible identificar el agente etiológico, aunque se desconozca la especie o el género, utilizando partidores universales para amplificar el ADN de hongos, y luego secuenciar para identificar la especie (PCR universal o de amplio espectro) (32).

En la actualidad se realizan pruebas moleculares para la identificación y diferenciación del complejo *C. neoformans* / *C. gattii*, éstas han permitido agruparlas de acuerdo a sus patrones moleculares. Dentro de estas técnicas predominan la PCR huella digital con iniciadores universales como el M13, (GACA)4 y (GTG)5, el análisis del polimorfismo en longitud de fragmentos amplificados (AFLP), el análisis del polimorfismo en longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de los genes URA5 y PLB1 y la tipificación de secuencias multilocus (MLST) empleando siete genes conservados (CAP59, GPD1, LAC1, PLB1, SOD1, URA5 y la región IGS1). Estas pruebas han determinado 10 genotipos principales, para *C. neoformans* var. *grubii* tenemos el genotipo VN1/AFLP1, VNII/ VNIB/AFLP1A, VNII/AFLP1B para *C. neoformans* var. *neoformans* el genotipo VNIV/AFLP2 y para el híbrido AD el genotipo VNIII/ AFLP3. Para *C. gattii* tenemos para el serotipo C, los genotipos VG1/ AFLP4, VGII/AFLP6, VGIV/AFLP10 y para el serotipo B el VGIII/ AFLP5 y VGIV/AFLP7 y LAMP (17).

2.4.2 Sensibilidad y especificidad

Pruebas de rutina como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) son herramientas que nos ayudan en el diagnóstico clínico, pero una de las



principales desventajas es su alto costo debido al equipamiento que usa y su larga duración en que esta puede entregar resultados (33).

Por ello el nivel de sensibilidad y especificidad de la técnica LAMP es superior en contraste con las pruebas de PCR. Adicionalmente, LAMP amplifica el ADN del patógeno al punto de permitir una visualización directa de la reacción, por la liberación de pirofosfatos que causan turbidez. La amplificación por medio de LAMP también puede ser cuantitativa y depende del desplazamiento de la cadena por autociclado, realizado por la ADN polimerasa (34).

La efectividad de LAMP se basa en el diseño de primers o cebadores que deben ser muy específicos. A diferencia de la PCR, LAMP requiere entre 4 y 6 primers, los primers externos F3 y B3, que hibridan con las regiones externas de la secuencia diana, mientras que los internos FIP y BIP poseen secuencias en ambos sentidos que permiten la formación de un bucle. Los primers se diseñan de manera que puedan reconocer 8 regiones diana que permiten dar especificidad al método. El uso de una enzima termoestable hace de LAMP una técnica amigable que encaja en los parámetros de ser un método completo y eficaz (34).

2.4.3 Diferencias entre LAMP y PCR

La técnica de LAMP tiene la capacidad de amplificar ácidos nucleicos a temperaturas isotérmicas entre los 60°C y 65°C lo que permite optimizar el tiempo, requiere 6 primers; no requiere de la extracción de ADN, tampoco utiliza equipos sofisticados como el termociclador, las reacciones de amplificación de LAMP se realizan entre 35 y 60 minutos. A medida que la reacción de LAMP progresá, los iones de pirofosfato se unen a los iones de magnesio y forman un precipitado blanco de pirofosfato de magnesio por lo que es posible realizar una inspección visual y cuantificación de los resultados, para esto se puede utilizar una lámpara de luz ultravioleta o un colorante de fluorescencia, tiene menor inhibición, los inhibidores de PCR tienen poco impacto en las reacciones de LAMP (35).



La técnica de PCR requiere varios ciclos de temperatura, requiere 2 primers, necesita de más de una hora para realizar todo el proceso, además no permite la detección visual de los resultados, es sensible a los inhibidores de matriz, requiere desnaturización, hibridación y extensión (36).

2.5 Métodos de extracción de ADN de hongos

Estos métodos son la base para la obtención de ADN, el éxito de las técnicas empleadas en biología molecular depende en gran medida de éstos. Existen diversos métodos de extracción de ADN para los hongos patógenos. Uno de los problemas al trabajar con hongos es la pared celular y sus mecanismos de defensa, lo cual dificulta el acceso al interior para la extracción de ADN. Dicha pared se puede romper con acción de métodos físicos, químicos y enzimáticos descritos a continuación:

2.5.1. Métodos físicos

Los métodos físicos incluyen perlas de acero o microesferas de vidrio que actúan como medio físico que al ejercer una fuerza mecánica sobre una superficie provocan el cizallamiento de las células del hongo permitiendo la extracción del ADN del mismo (37).

2.5.2. Métodos químicos

Dentro de los métodos químicos de extracción de ADN de hongos incluyen una variedad de soluciones de lisis y dentro de ésta la urea puede causar una relajación parcial de la pared celular y la membrana de los hongos, permitiendo así la salida del ADN de las células (37). La urea desnaturaliza proteínas, altera los enlaces de hidrógeno en la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas y altera los enlaces de hidrógeno presentes en la estructura secundaria del ADN (38).

La urea se usa también para prevenir la degradación del ADN durante el almacenamiento de las muestras a temperatura ambiente hasta por 6 meses (39).



2.5.3. Métodos enzimáticos

Una de las enzimas que ayuda la digestión de la membrana celular es la proteinasa K. Ésta enzima sirve para romper o degradar a las proteínas que están unidas al ADN (40), sin comprometer su integridad (41), por lo que se emplean para la extracción de ADN.



CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del lugar de investigación

Las muestras fueron tomadas en 5 puntos estratégicos de las zonas urbanas con sobre población de palomas de la ciudad de Cuenca, estos puntos fueron el Mercado 10 de Agosto, la Plaza 9 de Octubre, el Parque San Sebastián, la Plaza Santo Domingo, y el Parque María Auxiliadora.

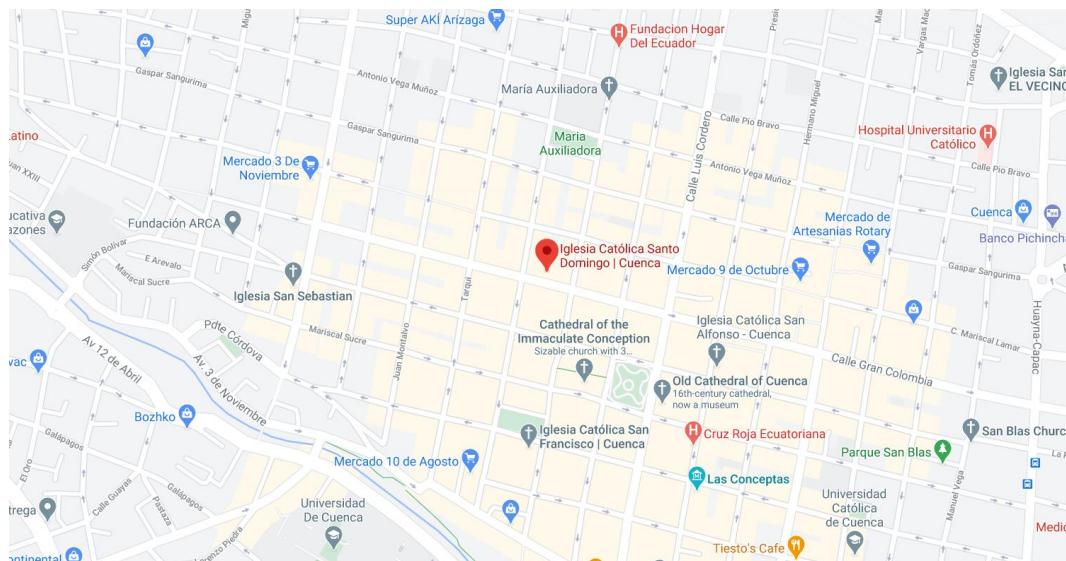


Figura 4. Mapa de la zona urbana de la ciudad de Cuenca

Fuente: Google Maps

3.2 Recolección y transporte de muestras de excretas secas y húmedas

3.2.1 Materiales de trabajo

Guantes de látex descartables

Respirador

Gafas protectoras

Bolsas de polietileno

Hisopos estériles

Balanza electrónica

Marcador rotulador de muestras

Cinta para rotular

Torundas de algodón

Gel refrigerante

Cooler



3.2.2 Materiales químicos

Solución antiséptica-desinfectante de Etanol al 70%.

Solución antiséptica de Yodo al 10%.

3.2.3 Procedimiento

Se recolectó 40 muestras (aproximadamente 100 mg de cada muestra) de excretas secas en los nidales de los 5 puntos estratégicos de la ciudad de Cuenca con sobre población de palomas. Adicionalmente se tomó 40 muestras de excretas de la cloaca de palomas con ayuda de un hisopo estéril, los animales se seleccionaron aleatoriamente, sin distinción de edad, sexo o tamaño, con la ayuda de la Comisión de Gestión Ambiental, entidad que colocó las jaulas trampa para capturar a las aves para la toma de muestras de las excretas húmedas.

Paso 1. Se tomaron las muestras de excretas secas a partir de los nidales y se colocaron en tubos eppendorf de 2.0 ml estériles, se rotularon y transportaron hasta el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Paso 2. Para las excretas húmedas se desinfectó la zona cloacal de las palomas con una solución de yodo al 10% para posteriormente tomar un hisopado cloacal. Los hisopos fueron colocados en tubos de vidrio estériles para su transporte en refrigeración y protegidos de la luz solar directa.

Paso 3. Se conservaron en el Laboratorio de Biología Molecular en congelación a una temperatura de -80°C hasta su posterior procesamiento para la obtención del material genético con las cuatro versiones de protocolos.

3.3 Extracción de ADN total de las muestras de excretas secas y excretas húmedas de palomas

3.3.1 Materiales biológicos

Muestras de excretas secas y húmedas (hisopados cloacales) de palomas.



3.3.2 Materiales químicos

Solución de lisis Protocolo A y B {20 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM de EDTA, 500 mM de NaCl, 2 % de SDS y 8 M de urea (Sigma, No. cat.: U1250)}.

Solución de lisis Protocolo C y D {22.50 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 112.5 mM de EDTA, 562.5 mM de NaCl, 2.25 % de SDS (Sigma, No. cat.: 71725)}.

Solución de Proteinasa K {Solución con 5 mg/ml de Proteinasa K (Sigma, Cat. No: P2308) en 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM de EDTA y 50% de Glicerol}.

Solución de Fenol/Cloroformo/A. isoamílico 25:24:1 (Sigma, No. cat.: 77619)

Solución de Etanol absoluto (Sigma, No. cat.: E7023)

Solución de Etanol al 70%

Agua grado biología molecular (Sigma, No. cat.: W4502)

3.3.3 Equipos e insumos

Micropipetas de diferentes volúmenes y sus puntas

Tubos eppendorf de diferentes volúmenes

Perlas de acero

Baños María

Tissuelyser

Microcentrífuga

3.3.4 Procedimiento (Protocolo A) para la extracción del ADN de las muestras de excretas secas

Paso 1. Se descongeló por 30 min a temperatura ambiente 10 de las muestras colectadas de excretas secas (\pm 100 mg) en tubos eppendorf de 2.0 ml.

Paso 2. Se adicionó a cada muestra 500 μ l de la solución de lisis (20 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM de EDTA, 500 mM de NaCl, 2% de SDS y 8 M de urea (método químico)).



Paso 3. Se mezcló en el vortex por 10 -15" e incubó por 3 h a temperatura ambiente ($\pm 23^{\circ}\text{C}$), con pasos de agitación (cada hora).

Paso 4. Se adicionó a los tubos 10 perlas de acero (método físico), lavadas y esterilizadas.

Paso 5. Se trató en el Tissuelyser (Qiagen) tres veces (3 min activo/3 min inactivo).

Paso 6. Una vez concluido el período de tratamiento de las muestras con el Tissuelyser, se adicionó a cada muestra 500 μl de la solución de Fenol/Cloroformo/A. isoamílico 25:24:1 y se mezcló en el vortex por 10 -15".

Paso 7. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 $\times g$ por 10 min a temperatura ambiente.

Paso 8. Se colectó el sobrenadante, y se colocó en un tubo nuevo (eppendorf de 1.5 ml) y se le adicionó 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío ($\pm 4^{\circ}\text{C}$), se mezcló la solución por inversión (4 - 6 veces) y se centrifugó en las condiciones arriba descritas (Paso 7).

Paso 9. Se descartó el sobrenadante por decantación y se adicionó 500 μl de solución de etanol al 70%, se mezcló por inversión y se volvió a centrifugar a 12,000 $\times g$ por 10 min a temperatura ambiente.

Paso 10. Se eliminó la solución de etanol al 70% por decantación, se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente, y una vez secas las pastillas se procedieron a resuspenderlas en 50 μl de agua grado biología molecular.



3.3.5 Procedimiento (Protocolo B) para la extracción del ADN de las muestras de excretas secas

En el caso de la versión B del protocolo de extracción de ADN total, fue el mismo procedimiento descrito para el Protocolo A, con la excepción de que no se dio tratamiento a las perlas de acero en el Tissuelyser (Ver **Pasos 4 y 5** de la sección **3.3.4**) en las 10 muestras a procesar.

3.3.6 Procedimiento (Protocolo C) para la extracción del ADN de las muestras de excretas secas

Paso 1. Se descongeló por 30 min a temperatura ambiente 10 de las muestras colectadas de excretas secas (± 100 mg) en tubos eppendorf de 2.0 ml.

Paso 2. Se le adicionó a cada muestra 450 μ l de la solución de lisis (22.50 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 112.5 mM de EDTA, 562.5 mM de NaCl, 2.25 % de SDS) y 50 μ l de la solución de proteinasa K (método enzimático).

Paso 3. Las muestras se mezclaron en el vortex por 10 -15" e incubaron por 14 - 16 h a 55°C.

Paso 4. Una vez concluido el tratamiento con la proteinasa K se adicionó a los tubos 10 perlas de acero, lavadas y esterilizadas.

Paso 5. Se trató en el Tissuelyser (Qiagen) tres veces (3 min activo/3 min inactivo).

Paso 6. Una vez concluido el período de tratamiento de las muestras con el Tissuelyser, se le adicionó a cada muestra 500 μ l de la solución de Fenol/Cloroformo/A. isoamílico 25:24:1 y se mezcló en el vortex por 10 -15".

Paso 7. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 x g por 10 min a temperatura ambiente.



Paso 8. Se colectó el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo (eppendorf de 1.5 ml), se le adicionó 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío ($\pm 4^{\circ}\text{C}$), se mezcló la solución por inversión (4 - 6 veces) y se centrifugó en las condiciones arriba descritas (Paso 7).

Paso 9. Se descartó el sobrenadante por decantación y adicionó 500 μl de una solución de etanol al 70%, se mezcló por inversión y se volvió a centrifugar a $12,000 \times g$ por 10 min a temperatura ambiente.

Paso 10. Se eliminó la solución de etanol al 70% por decantación, y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente, y una vez secas las pastillas se procedió a resuspenderlas en 50 μl de agua grado biología molecular.

3.3.7 Procedimiento (Protocolo D) para la extracción del ADN de las muestras de excretas secas

En el caso de la versión D del protocolo de extracción de ADN total, fue el mismo procedimiento descrito para el Protocolo C, con la excepción de que no se dio tratamiento las perlas de acero en el Tissuelyser (Ver **Pasos 4 y 5** de la sección 3.3.6) en las 10 muestras a procesar.

3.3.8 Procedimiento (Protocolo A) para la extracción del ADN de las muestras de excretas húmedas (hisopados cloacales)

Paso 1. Se descongeló por 30 min a temperatura ambiente 10 de las muestras colectadas de excretas húmedas (hisopados cloacales) y se les adicionó a los tubos que contienen el hisopo 500 μl de la solución de lisis (20 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM de EDTA, 500 mM de NaCl, 2 % de SDS y 8 M de urea).

Paso 2. Se mezcló en el vortex por 10 -15" e incubó por 3 h a temperatura ambiente ($\pm 23^{\circ}\text{C}$), con pasos de agitación (cada hora).



Paso 3. Una vez concluido el período de incubación se transfirió la muestra a un tubo eppendorf (2.0 ml), se adicionó las perlas de acero y aplicó los pasos 5 al 10 descritos en la sección 3.3.4.

3.3.9 Procedimiento (Protocolo B) para la extracción del ADN de las muestras de excretas húmedas (hisopados cloacales)

En el caso de la versión B del protocolo de extracción de ADN total fue el mismo procedimiento descrito para el Protocolo A para hisopados cloacales, con la excepción de que no se dio tratamiento las perlas de acero en el Tissuelyser (Ver **Pasos 4 y 5** de la sección 3.3.4) en las 10 muestras a procesar.

3.3.10 Procedimiento (Protocolo C) para la extracción del ADN de las muestras de excretas húmedas (hisopados cloacales)

Paso 1. Se descongelaron por 30 min a temperatura ambiente 10 de las muestras colectadas de excretas húmedas (hisopados cloacales) y se les adicionó a los tubos que contienen el hisopo (22.50 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 112.5 mM de EDTA, 562.5 mM de NaCl, 2.25 % de SDS) y 50 µl de la solución de proteinasa K.

Paso 2. Las muestras se mezclaron en el vortex por 10 -15" e incubaron por 14 - 16 h a 55°C.

Paso 3. Una vez concluido el tratamiento con la proteinasa K se adicionó a los tubos 10 perlas de acero, lavadas y esterilizadas, se continuó con los pasos 5 hasta el 10 (ahora pasos del 4 al 10) descritos en la sección 3.3.6.

3.3.11 Procedimiento (Protocolo D) para la extracción del ADN de las muestras de excretas húmedas (hisopados cloacales)

En el caso de la versión D del protocolo de extracción de ADN total, fue el mismo procedimiento descrito para el Protocolo C para hisopados cloacales, con la excepción de que no se dio tratamiento las perlas de acero en el



Tissuelyser (Ver **Pasos 4 y 5** de la sección **3.3.6**) en las 10 muestras a procesar.

Las muestras de ADN total obtenidas con las cuatro versiones de los protocolos fueron almacenadas a -20°C hasta su evaluación para estimar la concentración, calidad, integridad, y viabilidad para ser amplificadas mediante ensayos LAMP.

3.4 Obtención de cantidad y calidad del material genético de las muestras de excretas secas y húmedas con las cuatro modificaciones de los protocolos de extracción

3.4.1 Materiales biológicos

Muestras de ADN total extraído de las muestras de excretas secas y húmedas con los cuatro protocolos

3.4.2 Materiales químicos

Agua grado biología molecular

Solución desinfectante de Etanol al 70%

3.4.3 Equipos e insumos

Micropipetas de diferentes volúmenes y sus puntas

Tubos eppendorf de diferentes volúmenes

Espectrofotómetro (Epoch, BioTek instruments).

Adaptador para el espectrofotómetro (Take3 Trio Micro-Volume plate).

3.4.4 Procedimiento

Cada una de las muestras de ADN total obtenidas de las excretas secas y húmedas fue cuantificada con ayuda del espectrofotómetro (Epoch) para estimar la cantidad de ADN total (rendimiento), y la calidad (ratio 260/280).

Paso 1. Se descongeló las muestras de ADN total.

Paso 2. Se encendió el espectrofotómetro (Epoch), se limpió la placa (Take3) adaptadora con la solución de etanol al 70%, y se colocó por duplicado 2 μ l



de agua grado biología molecular y de la misma forma cada una de las muestras.

Paso 3. Se realizó las lecturas correspondientes para estimar la cantidad de material genético y el ratio 260/280.

Paso 4. Se tabuló los datos y se estimó las medias junto con los respectivos errores estándar de las cantidades de ADN obtenidos y de los ratios 260/280 para cada una de las cuatro modificaciones de los protocolos aplicados tanto a muestras secas como húmedas (hisopados cloacales).

3.5 Obtención de la integridad del material genético de las muestras de excretas secas y húmedas con las cuatro modificaciones de los protocolos de extracción

3.5.1 Materiales biológicos

Muestras de ADN total extraído de las muestras de excretas secas y húmedas con los cuatro protocolos.

3.5.2 Materiales químicos

Agarosa (Invitrogen, Cat. no.: 16500-500).

Solución buffer TAE 1X (40 mM de Tris-acetato, 1 mM de EDTA, pH 8.0) (Sigma, Cat. no.: T4661, A6283, EDS, S8045).

Solución de bromuro de etidio a 10 mg/ml (Sigma, Cat. no.: E7637).

Solución buffer de carga 6X para ADN (60 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 6 mM de EDTA, pH 8.0, 0.3 % de azul de bromofenol, 0.3 de xilencianol y 30 % de glicerol) (Sigma, Cat. no.: T4661, 320331, EDS, S8045, B8026, X1426, G5516).

Marcador de peso molecular (Thermo Fisher Scientific, Cat. no.:SM1331)

3.5.3 Equipos e insumos

Micropipetas (10, 100 y 1000 μ l) con sus respectivas puntas.

Microtubos eppendorf de diferentes volúmenes.

Vortex.



Cámara de electroforesis horizontal (Compact S, Biometra).

Horno de microondas.

Balanza.

Potenciómetro (pHmetro).

Platina de agitación.

Transiluminador.

Fotodocumentador (Gel Documentation System, BioRad).

Computadora de escritorio.

3.5.4 Procedimiento

Para observar la integridad del material genético obtenido, se procedió a disolver 100 ng del ADN total de las muestras de excretas en geles al 1.5% de agarosa-TAE teñido con bromuro de etidio.

Paso 1. Se pesó 0.45 g de agarosa y se adicionó a un matraz Erlenmeyer con 30 ml de solución buffer TAE 1X, la agarosa se disolvió por calor con ayuda de un horno de microondas.

Paso 2. Una vez disuelta completamente la agarosa, la mezcla se enfrió y se adicionó 1 µl de una solución de bromuro de etidio a 10 mg/ml. Se mezcló completamente, se vació en el molde para el gel y se colocó inmediatamente el peine para formar los pozos.

Paso 3. Una vez gelificada la solución, el gel se colocó en la cámara de electroforesis y se adicionó la cantidad de solución buffer TAE 1X necesaria para cubrir completamente el gel.

Paso 4. Luego se cargó a cada una de las muestras en el gel, y en los pocillos se colocó 500 ng del marcador de peso molecular de ADN.

Paso 5. Concluido el cargado de las muestras y el marcador de peso, se colocó la tapa y se conectó la corriente eléctrica a un voltaje de 90 por 30 a 45 min.



Paso 6. Una vez resueltos los productos de PCR, se visualizó en el transiluminador y con fotodocumentador se tomó una imagen del mismo.

Paso 7. Se consideró que el material genético obtenido fue de alto peso al observar una banda con un tamaño mayor a 20 kbp, de peso intermedio entre 20 a 1 kbp y de bajo peso si tiene un tamaño menor a 1 kbp. Si el ADN obtenido no mostró una banda, es decir se observó distribuida a lo largo del carril se consideró parcialmente degradado.

3.6 Obtención de la viabilidad del material genético de las muestras de excretas secas y húmedas con las cuatro modificaciones de los protocolos de extracción para ser amplificado mediante ensayos LAMP.

3.6.1 Materiales biológicos

Muestras de ADN total extraído de las muestras de excretas secas y húmedas con los cuatro protocolos.

3.6.2 Materiales químicos o reactivos

Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. No.: W4502)

Oligonucleótidos para detección de material genético de las palomas (*Columba livia*) (42):

Col-FIP (F1c + F2):

TGGGGTTAACGGGTTACCCCTGACTGGCTCAGCTTGTGC

Col-BIP (B1c + B2):

TTCGTGATGGGGATCGGGGAGAGCTTGACCCGCACTT

Col-F3: CCTTAGATGTCCGGGCT

Col-B3: GGCAGGGACTTAATCACCGC

Oligonucleótidos para detección genérica de material genético de hongos patógenos (43):

HoP-FIP (F1c + F2):

CCAATATTAGCTTAGATGGAATTGAGTCGAGTTGTTGGGA



HoP-BIP (B1c + B2):

AGACCGATAGCGAACAAAGTACTACTTTCACTCTTTCAAAGT

HoP-F3: GAGGGTGAGAATCCCGT

HoP-B3: CTTCCCCTTCACAACAATTCAC

Oligonucleótidos para detección de material genético del hongo *Cryptococcus neoformans var. neoformans* (*Filobasidiella neoformans*) (44):

Cneo-FIP (F1c + F2):

GCATTCTGTCTCCTACTCTGCCAATTGCGTGGACGACTTGCTC

Cneo-BIP (B1c + B2):

CTGTCCCCCCCCTGTTATTCAATTATCGTAGAATACAGGAGCACCCCTAG

Cneo-F3: AGAAGTCTTGACTCGGTCG

Cneo-B3: GAAAGGCGCATTCTCGAGC

Reacción buffer 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8.8 a 25°C; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 10 mM KCl; 2 mM MgSO₄; 0.1% Triton X-100).

Bst ADN polimerasa.

dNTP's (10 mM c/u).

3.6.3 Equipos e insumos

Micropipetas (10, 100 y 1000 µl) con sus respectivas puntas.

Microtubos eppendorf de diferentes volúmenes.

Microtubos de PCR.

Nanocentrífuga.

Termociclador (Mastercycler® nexus gradien thermal cycler, Eppendorf) o

Baño María.

Transiluminador.

Fotodocumentador (Gel Documentation System, BioRad).

Computadora de escritorio.



3.6.4 Procedimiento

Para evidenciar la viabilidad del material genético obtenido de las excretas secas o húmedas de las palomas mediante las cuatro versiones de protocolos de extracción se realizó tres ensayos LAMP, el primero de ellos para la detección de material genético de las palomas, el segundo para detección genérica de hongos, algunos de ellos patógenos, y el último ensayo para la detección específica de material genético de *C. neoformans* var *neoformans*. Los ensayos se realizaron en ese orden, para lo cual se prepararon las mezclas de reacción con cada uno de los grupos de oligonucleótidos o primers específicos, siguiendo el siguiente procedimiento.

Paso 1. Previo a realizar el ensayo de amplificación LAMP se procedió a descongelar cada una de las muestras de ADN total extraído de las muestras de excretas secas o húmedas y los reactivos necesarios.

Paso 2. Posteriormente se realizó una premezcla para el ensayo de amplificación LAMP para detección de ADN del material genético deseado (palomas, de hongos en general o de *C. neoformans* var *neoformans*) con el volumen requerido para el número de muestras a analizar (12.5 µl de volumen final por reacción) colocando en el siguiente orden los reactivos exceptuando las muestras de ADN total.

**Tabla Nº 1.** Reactivos para el ensayo de amplificación LAMP.

Reactivos	Concentración		Volumen por reacción*
	Inicial	Final	
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	6.1 µl
Buffer de amplificación 10X	10X	1X	1.25 µl
Betaína	4 M	800 mM	2.5 µl
dNTP's	10 mM c/u	0.28 mM	0.35 µl
Oligonucleótido correspondiente FIP	100 µM	1.6 µM	0.2 µl
Oligonucleótido correspondiente BIP	100 µM	1.6 µM	0.2 µl
Oligonucleótido correspondiente F3	25 µM	0.2 µM	0.1 µl
Oligonucleótido correspondiente B3	25 µM	0.2 µM	0.1 µl
Muestra de ADN total	--- µg/µl	--- µg/µl	3 µl
Volumen final	-----	-----	12.5 µl

*n= número de muestras.

Paso 3. La premezcla preparada se llevó al vortex por 4 a 6", y se colectó por centrifugación (nanocentrífuga) a máxima velocidad durante 15 a 20".

Paso 4. Se marcaron los tubos de PCR (200 µl), se les colocó 9 µl de la premezcla, y se les adicionó 3 µl de la muestra de ADN total correspondiente.

Paso 5. Los tubos con las reacciones de amplificación (12.5 µl) se colocaron en el baño María/termociclador para la incubación de esta premezcla con el fin de que suceda la desnaturización y el alineamiento:

Tabla Nº 2. Tiempo y temperatura para la desnaturización y alineamiento.

Paso	Desnaturalización	Alineamiento
Tiempo (min', s'')	5 '	5 '
Temperatura (°C)	94°C	4°C



Paso 6. Culminado ese tiempo, se sacó los tubos de PCR (200 μ l) del baño María/termociclador y se añadió la enzima para que suceda la extensión y la inactivación:

Tabla Nº 3. Concentración de Enzima Bsm ADN polimerasa.

Reactivo	Concentración		Volumen por reacción
	Inicial	Final	
Enzima Bsm ADN polimerasa	8 U/ μ l	0.32 U/ μ l	0.5 μ l
Volumen final	----	---	12.5 μ l

Paso 7. Posteriormente se sometió esta mezcla al proceso de extensión e inactivación en el baño María/termociclador.

Tabla Nº 4. Tiempo y Temperatura de extensión e Inactivación.

Paso	Extensión	Inactivación
Tiempo (min', s')	60 '	10 '
Temperatura (°C)	60°C	80°C

3.7 Detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con bromuro de etidio

Para la detección de los productos de amplificación de los ensayos LAMP, se realizó su resolución mediante electroforesis en geles al 1.5% de Agarosa-TAE teñidos con bromuro de etidio, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.5.; se consideró una reacción de amplificación positiva si es observado el patrón de múltiples de fragmentos (escalera) esperados.

3.8 Extracción de material genético de sangre de paloma (*Columba livia*) para control de proceso positivo (Ver Anexo 2)

3.9 Diseño experimental

Para el análisis de las variables en estudio, los datos fueron introducidos en el programa informático de Microsoft Excel® y posteriormente sistematizados y tabulados en el programa estadístico Infostat.



Se utilizó el programa Ky.Plot versión 5.0 para los gráficos de estimación de medias de concentración de ADN total obtenido y ratio 260/280; mediante la prueba de Duncan se determinaron las diferencias significativas entre protocolos y extractos; se analizó la concentración o cantidad de ADN total obtenido y el ratio 260/280 o calidad por protocolo, por extracto y por interacción entre protocolo y extracto.

Finalmente se aplicó la prueba de Chi cuadrado de Pearson para comparar porcentajes entre extractos y protocolos; y, para determinar la integridad del material genético.

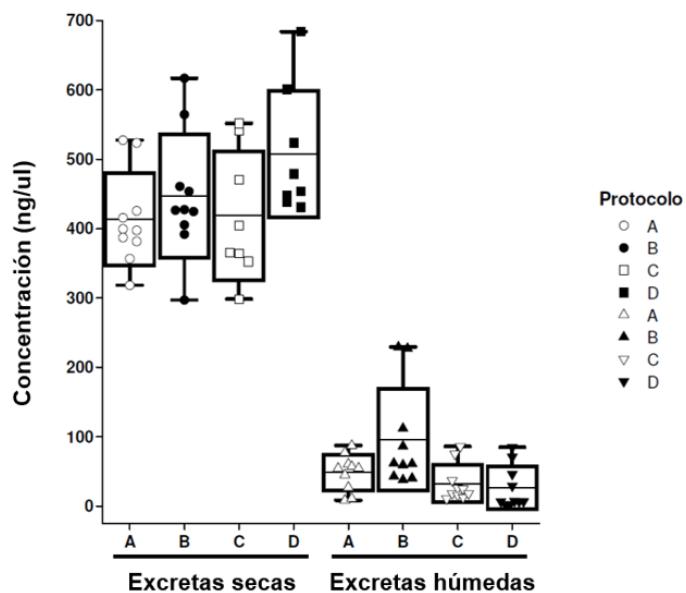
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la eficacia de 4 protocolos de extracción de ADN para hongos patógenos a partir de excretas secas (ES) y excretas húmedas (EH) de palomas mediante ensayos LAMP como una alternativa para los métodos tradicionales de diagnóstico de hongos. Los resultados están dados en 4 secciones para cantidad, calidad, integridad y viabilidad del material genético obtenido a partir de las muestras.

4.1 Evaluación de la cantidad del material genético obtenido de las muestras de excretas secas y húmedas con las cuatro modificaciones de los protocolos de extracción.

Las muestras de ADN total obtenidas de las ES y EH se cuantificaron con ayuda del espectrofotómetro y se realizaron las lecturas correspondientes por concentración en ng/ul.

Gráfico 1. Concentración (ng/ul) de material genético en excretas secas y húmedas en los diferentes protocolos de extracción.



El gráfico muestra una mayor media de concentración de ADN total obtenido en ng/ul de los extractos de ES en comparación con las EH, y dentro del extracto de EH el protocolo B muestra una mayor dispersión en comparación con los demás protocolos.

**Tabla Nº 5.** Coeficiente de varianza de la concentración de ADN total.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Concentración	80	0.91	0.90	26.90

Del total de las 80 muestras analizadas existe un coeficiente de variación de 26.9 lo que significa que existe una variación elevada y aceptable entre protocolos.

Tabla Nº 6. Análisis de concentración de ADN total (ng/ul) por protocolo.

Test :Duncan Alfa=0.05				
PROTOCOLO	Medias	n	E.E	
C	216.36	20	14.63	A
A	226.14	20	14.63	A B
D	263.68	20	14.63	B
B	266.77	20	14.63	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

En el análisis se observa que los protocolos C y A no difieren significativamente entre ellos, al igual que los protocolos A, D y B; sin embargo, cabe recalcar que la concentración del protocolo C tuvo una menor absorbancia que difiere significativamente del protocolo D y B, siendo B, el que tuvo mayor absorbancia lo que indica mayor concentración de ADN.

Tabla Nº 7. Análisis de concentración de ADN total (ng/ul) por extracto

Test :Duncan Alfa=0.05				
EXTRACTO	Medias	n	E.E	
EH	47.20	40	10.34	A
ES	439.28	40	10.34	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

De las 80 muestras de ADN total analizadas mediante espectrofotometría, la concentración de material genético fue significativamente mayor en las ES, es decir tuvieron una mayor absorbancia medida en nanogramos/microlitro (ng/ul) comparadas con las muestras de EH, esto puede deberse a la cantidad de pigmentos, proteínas y contaminantes como los ácidos húmicos que se encuentran presentes en los suelos y en nuestro caso en los niales considerados como materia orgánica al igual que los suelos, lo que hace que estas muestras contengan mayor absorbancia en comparación con las muestras



de EH, esta información se corrobora con lo mencionado por Donaire et al. (45), donde indican que la eficiencia de la extracción de ADN de los microorganismos presentes en el suelo depende del contenido celular, las características físico químicas, pH, contenidos de materia orgánica (ácidos húmicos); entre otros, siendo factores importantes que influyen para obtener un protocolo de purificación y extracción eficaz.

Tabla Nº 8. Análisis de concentración de ADN total (ng/ul) por interacción entre protocolo y extracto

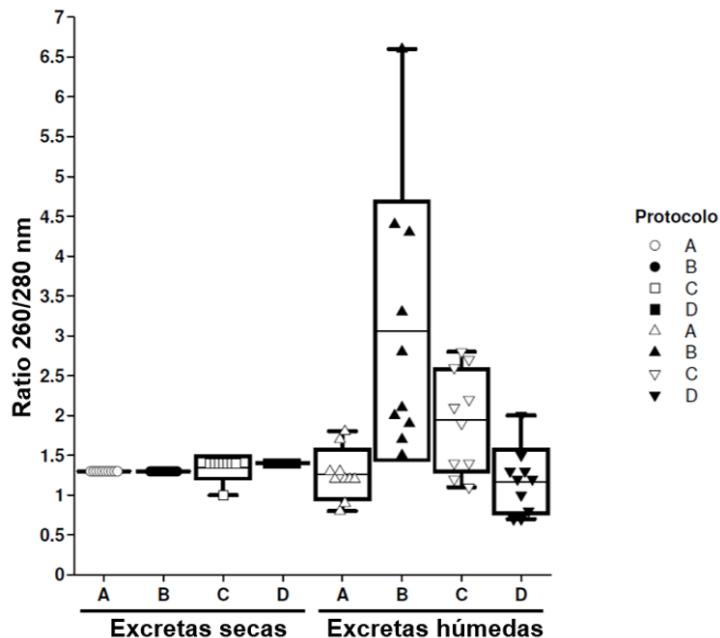
Test :Duncan Alfa=0.05					
PROTOCOLO	EXTRACTO	MEDIAS	n	E.E	
D	EH	24.38	10	20.69	A
C	EH	29.48	10	20.69	A
A	EH	43.61	10	20.69	A B
B	EH	91.32	10	20.69	B
C	ES	403.24	10	20.69	C
A	ES	408.67	10	20.69	C
B	ES	442.22	10	20.69	C
D	ES	502.99	10	20.69	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

En el análisis de interacción entre protocolos y extracto se observa que los protocolos D, C, A de EH no difieren significativamente entre sí, al igual que los protocolos A y B; los protocolos C, A y B de ES no presentan diferencias significativas entre sí, mientras que el protocolo D de ES presenta una concentración mayor difiriendo significativamente con respecto a los demás protocolos.

4.2 Evaluación de la calidad del material genético obtenido de las muestras de excretas secas y húmedas con las cuatro modificaciones de los protocolos de extracción.

Gráfico 2. Ratio 260/280 en excretas secas y húmedas de los diferentes protocolos de extracción de material genético



Para verificar la pureza del ADN total y que las muestras tengan una calidad adecuada la relación de absorbancias debe estar en 1.8 (46), el gráfico indica que los protocolos de las ES están por debajo del parámetro ideal y que los protocolos de las EH muestran una mayor dispersión sobre todo en el protocolo B.

Tabla Nº 9. Coeficiente de varianza de Ratio 260/280

Variable	n	R ²	R ² Aj	CV
Ratio 260/280	80	0.48	0.43	40.23

Del total de las 80 muestras analizadas existe un coeficiente de variación de 40.23 lo que significa que hay una alta variación de pureza en comparación con la concentración.



Tabla Nº 10. Análisis del ratio 260/280 mediante la prueba de Duncan por protocolo

Test: Duncan Alfa=0.05				
PROTOCOLO	Medias	n	E.E.	
D	1.29	20	0.14	A
A	1.29	20	0.14	A
C	1.64	20	0.14	A
B	2.19	20	0.14	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

En el análisis del ratio 260/280 es decir la calidad o pureza por protocolo, se observa que los protocolos D, A y C no difieren significativamente entre sí, mientras que el protocolo B difiere significativamente de los demás; de éstos el que se acerca al parámetro ideal del ratio que es 1.8 de calidad es el protocolo C.

Tabla Nº 11. Análisis del ratio 260/280 mediante la prueba de Duncan por extracto

Test: Duncan Alfa=0.05				
EXTRACTO	Medias	n	E.E.	
ES	1.35	40	0.10	A
EH	1.85	40	0.10	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

En el análisis del ratio 260/280 por extracto, se observa que las ES y EH difieren significativamente y dentro de éstas, la media del extracto de EH es de 1.85 indicando que está cerca del parámetro ideal de calidad, lo que nos permite concluir que este tipo de extracto es más puro en comparación a las ES debido a que tienen menos contaminantes y ausencia de ácidos húmicos.



Tabla Nº 12. Análisis del ratio 260/280 mediante la prueba de Duncan por interacción entre protocolo y extracto

Test: Duncan Alfa=0.05					
PROTOCOLO	EXTRACTO	Medias	n	E.E.	
D	EH	1.16	10	0.20	A
A	EH	1.27	10	0.20	A
A	ES	1.32	10	0.20	A B
B	ES	1.33	10	0.20	A B
C	ES	1.34	10	0.20	A B
D	ES	1.41	10	0.20	A B
C	EH	1.94	10	0.20	B
B	EH	3.04	10	0.20	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Los datos de la **Tabla Nº 12** muestran que el protocolo B de EH difiere significativamente del resto de protocolos lo que significa que es el protocolo que más se aleja del parámetro ideal de pureza; sin embargo, el protocolo C de EH con un valor de 1.94 es el que más se acerca al parámetro ideal de pureza que es 1.8, lo que concuerda con la media del protocolo C (1,64) del análisis del ratio 260/280 por protocolo de la **Tabla Nº 10** que también se acerca al parámetro ideal, esto nos permite sugerir que con el tratamiento de solución de lisis, proteinasa K y perlas de acero se obtiene un ADN de mejor calidad comparado con los demás protocolos. Los protocolos D y A de EH junto con los protocolos, A, B, C, D de ES se encuentran debajo del valor óptimo sin presentar diferencias significativas entre sí, esto se puede deber a la presencia de proteínas que contaminan el ADN y hacen que los valores del ratio 260/280 sean menores que 1.8 como lo mencionan Bolano et al. (37).



4.3 Evaluación de la integridad del material genético obtenido de las muestras de excretas secas y húmedas con las cuatro modificaciones de los protocolos de extracción.

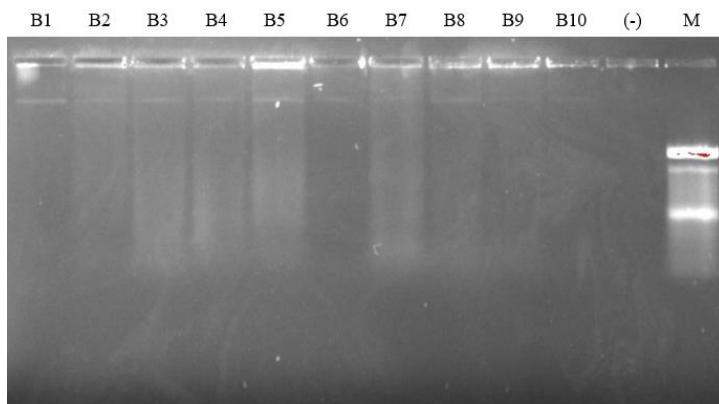


Figura 5. Evaluación de la integridad del Protocolo B de las muestras de excretas húmedas, (B1 y B6) ADN íntegro y (B2, B3, B4, B5, B7, B8, B9 y B10) ADN fragmentado.

Los resultados de la integridad de las 80 muestras se pueden observar en el **Anexo 3**.

Tabla Nº 13. Frecuencias relativas al total (%) con relación al extracto

INTEGRIDAD	EH	ES	Total
ADN poco fragmentado	6.25	33.75	40.00
Ausente	3.75	16.25	20.00
Fragmentado	17.50	0.00	17.50
Integro	22.50	0.00	22.50
Total	50.00	50.00	100.00

Chi Cuadrado Pearson 53.38 p < 0.0001

Los datos indican que el extracto de excretas húmedas presenta un porcentaje de ADN íntegro de 22.5% comparado con el extracto de excretas secas que no tuvo ningún valor para ADN íntegro; es decir existe dependencia entre la integridad y los extractos de EH y ES, evidenciando que las EH permiten obtener un mejor porcentaje de integridad.

**Tabla Nº 14.** Frecuencias relativas al total (%), con relación al protocolo

INTEGRIDAD	A	B	C	D	Total
ADN poco fragmentado	12.50	8.75	6.25	12.50	40.00
Ausente	0.00	3.75	13.75	2.50	20.00
Fragmentado	1.25	10.00	3.75	2.50	17.50
Integro	11.25	2.50	1.25	7.50	22.50
Total	25.00	25.00	25.00	25.50	100.00

Chi Cuadrado Pearson 53.38 p < 0.0001

Al evaluar la integridad por protocolo, el protocolo A fue el que tuvo mayor porcentaje de ADN poco fragmentado y ADN íntegro, seguido por el protocolo D que tiene el mismo porcentaje de ADN poco fragmentado pero menor cantidad de ADN íntegro, a pesar de que el protocolo C presentó parámetros de pureza cercanos al óptimo su porcentaje de integridad fue inferior en comparación con los demás protocolos y su porcentaje de ADN ausente fue el más alto, lo que sugiere que el protocolo A con solución de lisis, urea y perlas de acero permite obtener mayor cantidad de ADN íntegro comparado con los otros protocolos, concordando con Bolano et al. (37), quienes mencionan que el tratamiento mecánico corta varias moléculas de ADN lo que influye altamente en la fragmentación del mismo.

Alejos et al. (46), mencionan que la integridad depende altamente de la eficiencia de los métodos de extracción de ADN y que el ADN fragmentado dificulta la amplificación de productos LAMP de alto peso molecular, esto concuerda con nuestro estudio donde el porcentaje de ADN poco fragmentado y fragmentado sumado fue de 57,5% y ausente de un 20% lo que pudo haber influenciado directamente en la amplificación de ADN.



4.4 Evaluación de la viabilidad del material genético obtenido de las muestras de excretas secas y húmedas con las cuatro modificaciones de los protocolos de extracción.

En la **Figura 6**, se observa 27 carriles negativos para la detección de ADN de paloma (*Columba livia*) con su respectivo control positivo.

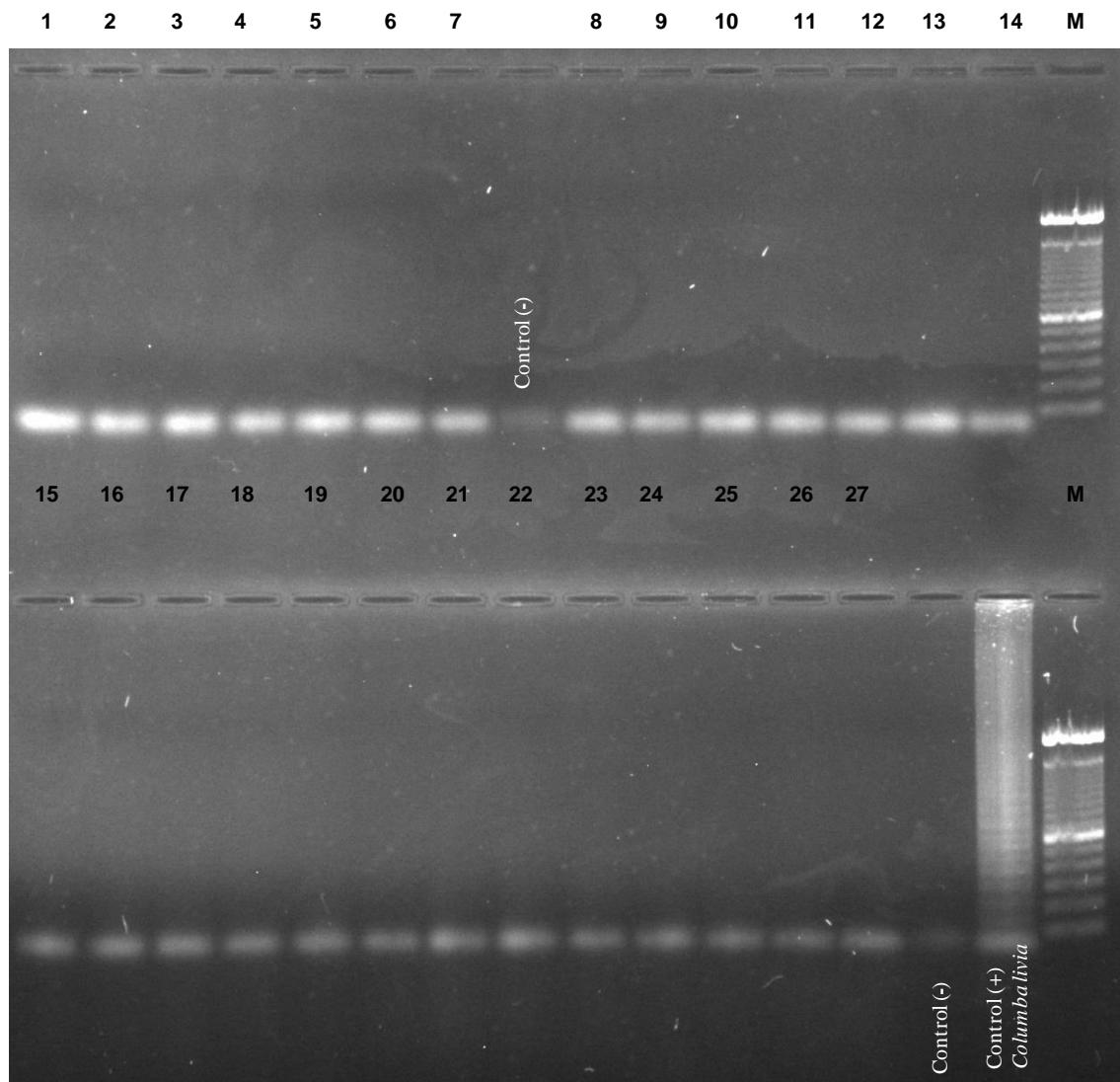


Figura 6. Evaluación de la viabilidad de material genético de palomas en excretas húmedas, Marcador de peso molecular (M).

Para la viabilidad del material genético se realizó un ensayo LAMP de control de proceso para ADN de paloma que permite mostrar claramente que los oligonucleótidos o primers empleados son los correctos, dejando en evidencia



que el material genético de las muestras de ES y EH tienen menor eficiencia para la detección de ADN de paloma comparado con las muestras de ADN de sangre de paloma. Ver **Anexo 2**, paso 2.1.3.5.

En el procedimiento de análisis de las muestras de ES y EH mediante ensayos LAMP con el ADN total de las 80 muestras dio resultados negativos en cada uno de los protocolos para la presencia de ADN de palomas, ADN de hongos, y finalmente para ADN de *C. neoformans* es decir no se observó el patrón de múltiples fragmentos, esto pudo ser debido principalmente a que no se obtuvo un ADN puro de un previo aislamiento en cultivo para el caso de los hongos como se lo hace convencionalmente. Esto concuerda con los estudios realizados por Mseddi et al. (47) que realizaron cultivos previos del hongo *C. neoformans* para la extracción del material genético y al igual que Bolano et al. (37), que también realizaron cultivos de *C. neoformans* a partir de muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con SIDA con criptococosis utilizando métodos de lisis con urea y tratamiento físico con microesferas de vidrio donde los resultados fueron positivos para la extracción de ADN de *C. neoformans*. Es decir, es importante que exista una fuente pura del hongo, demostrando que el extracto o muestra influye en la detección del material genético de los mismos.

Uno de los factores que pudo haber contribuido a los resultados negativos en la amplificación para detección de *C. neoformans* pudo ser su envoltura lo que se podría interpretar basándose en el estudio de Bolano et al. (37) donde menciona que el aislamiento del ADN de *C. neoformans* es difícil debido a que posee una cápsula gruesa y resistente que representa al menos el 70% del volumen celular. También Perfect et al. (48); mencionan que las enzimas degradadoras de la envoltura deben ser aplicadas en la fase logarítmica media y tardía del crecimiento de las levaduras para romper la cápsula, además describe que *C. neoformans* puede liberar una gran cantidad de nucleasas sumado a la contaminación masiva de las preparaciones ADN/ARN con polisacáridos de la cápsula de *Cryptococcus*, los que generalmente se precipitan con los pasos de purificación de los ácidos nucleicos. El uso de detergentes puede ayudar a reducir la cantidad de polisacáridos contaminantes del ADN. En



la mayoría de los casos la amplificación no se ve afectada por la contaminación de polisacáridos, pero en ciertas ocasiones grandes cantidades de polisacáridos pueden alterar las técnicas de amplificación de ADN.

Otra de las causas por la que los resultados no fueron satisfactorios en la detección de material genético ya sea de palomas, hongos patógenos y en específico *C. neoformans* en el caso de las muestras de ES podría ser que al ser tomadas directamente de los nidales que estaban en contacto con el suelo y al ser considerado materia orgánica existe una alta presencia de inhibidores que pudieron alterar la eficacia de los protocolos de extracción, esto nos permite plantear que la presencia de inhibidores ha debido ser similar en todas las muestras, lo que sugiere un problema inherente a los protocolos de extracción que aparentemente resultaron ser afectados en cuanto a eficiencia de extracción, grado de pureza y por ende amplificación de ADN; esto coincide con Donaire et al. (45), que mencionan que los protocolos de extracción de ADN a partir de muestras de suelo, por la presencia de sustancias húmicas y fenólicas afectan la calidad del ADN extraído, lo que repercuten en el desarrollo de posteriores estudios moleculares ya que pueden inhibir la actividad polimerasa, enzimas de restricción e incluso interferir con la hibridación de ADN. Otros autores como Sagova et al. (49), indican que el bajo rendimiento del ADN puede ser atribuido a la unión del ADN a ciertas partículas como el humus o materia orgánica que puede absorber el material genético libre o degradarlo.

Además, es importante mencionar que para realizar los protocolos de extracción con ES se emplearon 100 mg lo que es una muestra muy pequeña que pudo dificultar la obtención de ADN con las cuatro variaciones de protocolos de extracción; esto coincide con Castañeda et al. (50) que en su estudio utilizaron de 30 mg a 200 mg de muestras ambientales para extracción de ADN de *C. neoformans* y mencionan que la baja cantidad de ADN que usualmente se recupera a partir de suelos imposibilita determinar la presencia de ADN directamente con medición espectrofotométrica. Mientras que en el caso de las EH un estudio realizado por Eriksson et al. (51) mencionan que una de las principales dificultades de la extracción de ADN de EH de aves es la naturaleza



de las mismas, en donde, se mezclan residuos digestivos con material urinario en la cloaca que luego se elimina en una deposición fecal heterogénea. Esto resulta en una mezcla de moléculas de ácido úrico, sales biliares, nucleasas y polisacáridos no degradados o parcialmente degradados que interfieren en los procedimientos de extracción de ADN.

Para el caso de *A. fumigatus* e *H. capsulatum* al encontrarse en mayor cantidad en las excretas de palomas se esperaba que fueran amplificados y al no ser así en el caso de *A. fumigatus* pudo ser debido a sus factores de virulencia como la melanina que es un pigmento que protege el genoma de la conidia de la luz ultravioleta, lisis enzimática y oxidación, lo que pudo interferir en los protocolos de extracción de ADN empleados (2); y para el caso de *H. capsulatum* pudo ser debido al tipo de muestras que se empleó puesto que en un estudio realizado por Monroy *et al.* (52); se utilizaron cepas puras de *H. capsulatum* identificadas por métodos morfológicos y serológicos en donde al igual que en nuestro estudio se empleó métodos enzimáticos como el uso de la proteinasa K, mecánicos, y químicos, donde se observó que el método enzimático mostró bandas cromosomales íntegras y regiones donde el ADN estaba fragmentado lo que no ocurrió en este estudio debido a que no se usaron técnicas de cultivo previo para la obtención de muestras puras del hongo.



CAPITULO V: CONCLUSIONES

La evaluación de cantidad y calidad de ADN total permitió identificar que en los protocolos de las excretas secas se puede obtener mayor concentración de ADN total, mientras que las excretas húmedas permiten obtener un promedio de pureza cercano al ideal; dentro de los protocolos, el C con excretas húmedas fue el que tuvo una media de pureza dentro del parámetro óptimo.

La valoración de integridad expuso que las excretas húmedas presentan el mayor porcentaje de muestras con ADN íntegro con respecto a las muestras de excretas secas; considerando los protocolos, el A fue el que presentó el mayor porcentaje de ADN íntegro.

Los protocolos de extracción y el tipo de muestra influyen directamente en la cantidad, calidad e integridad de ADN total, y estas a su vez influyen en la amplificación de ADN, nuestro estudio presentó resultados negativos para los cuatro protocolos con excretas secas y húmedas; es decir, no hubo amplificación de ADN de paloma, hongos patógenos y entre estos *C. neoformans* mediante los ensayos de LAMP.

Los hongos patógenos son organismos con estructuras celulares complejas lo que dificulta el desarrollo de un único método universal de extracción de ADN.



CAPITULO VI: RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar otros protocolos de extracción de ADN de hongos patógenos de palomas donde se puede realizar modificaciones sobre todo en la cantidad de muestra a utilizar, y dentro del tipo de muestra considerar que las excretas húmedas presentan mejor calidad e integridad.

Si se decide trabajar con excretas secas, para mejorar su pureza se puede recomendar un pre tratamiento a las muestras antes de la extracción de ADN, donde se usen compuestos que separen los ácidos húmicos y fenólicos de las mismas.

Se recomienda verificar los primers de los hongos sobre todo de *C. neoformans* mediante un control de proceso positivo que demuestre la veracidad de los mismos realizando anteriormente un cultivo y verificarlo.

Realizar pruebas pilotos para ver la factibilidad de la investigación.



CAPITULO VII: BIBLIOGRAFÍA

1. Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci Transl Med* 4. 2012;4(165):165-13.
2. Indranil S. Veterinary mycology. Veterinary Mycology. New Delhi: Springer India; 2015. 1-179 p.
3. Olalla A, Ruiz G, Ruvalcaba I, Mendoza R. Palomas, Especies invasoras. *Biodiversitas*. 2009;82:7-10.
4. Bernal K. "Determinación de la presencia de parásitos gastrointestinales en palomas de castilla (*Columba livia*) en la ciudad de Quito tomando como referencia tres lugares pilotos «La Magdalena», "Plaza de San Francisco" y «Cotocollao». *J appl Microbiol*. 2015;119(3):859-67.
5. Estrada G, Ramírez M. Micología General. Manizales; 2019. 345 p.
6. Gómez F. Características generales de los hongos e infecciones sistémicas y oportunistas de las micosis tropicales. En: Micología. Editorial Medica Panamericana; p. 1-20.
7. Perfect JR. *Cryptococcus neoformans* : A sugar-coated killer with designer genes. *FEMS Immunol Med Microbiol*. septiembre de 2005;45(3):395-404. DOI:[10.1016/j.femsim.2005.06.005](https://doi.org/10.1016/j.femsim.2005.06.005).
8. Emmons CW. Saprophytic sources of *cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*columba livia*). *Am J Epidemiol*. 1955;62(3):227-32.
9. Puchades M, Colom F, Sánchez M. *Cryptococcus y Medio Ambiente (Tesis)*. 2016; 1-40. Recuperado:http://dspace.umh.es/bitstream/11000/3474/1/PuchadesReig_Malva.pdf en 09/10/2018.
10. Baró T. Epidemiología de la criptococosis en España: Caracterización de los aislados de *Cryptococcus neoformans*. 2002. Recuperado: <https://www.tdx.cat/handle/10803/3864;jsessionid=F96548649C464AE9842A0C8834D6D1F0#page=1> en 15/10/2018.
11. Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. Scientifica (Cairo). 2013;(20):1-23.



12. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol.* 2015;78:16-48.
13. Negroni R. Histoplasmosis en América Latina. *Biomédica.* 2011;31:1-4.
14. Saad A, Yildiran S, Gonlum A, Ali M, Doganci L. *Cryptococcus neoformans* varieties from material under the canopies of eucalyptus trees and pigeon dropping samples from four major cities in Jordan. En: *Mycopathologia.* Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2004. p. 195-9.
15. Pal M, Tesfaye S, Dave P. Cryptococcosis: An Enigmatic Mycosis of Humans and Animals. *J Environ Occup Sci.* 2014;3(1):53-60.
16. Wickes BL, Mayorga ME, Edman U, Edman JC. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: Association with the a-mating type (monokaryotic/dikaryotic/clamp connection/hyphae). *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93(14):7327-31.
17. Tello M, Gutiérrez E, Béjar V, Galarza C, Ramos W, Ortega A. Criptococcosis. *Rev Médica Risaralda.* 2013;19:147-53.
18. Lazéra MS, Pires FDA, Camillo-Coura L, Nishikawa MM, Bezerra CCF, Trilles L, et al. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J Med Vet Mycol.* 1996;34(2):127-31.
19. World Health Organization Regional Office for South-East Asia. Laboratory manual for diagnosis of fungal opportunistic infections in HIV/AIDS patients. Nueva Delhi: World Health Organization; 2009. 1-102 p. Recuperado: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/205404> en 15/10/2018.
20. Arias Y, Morales S, Villacaqui E. Presencia de *Histoplasma capsulatum* en Heces de Palomas Mensajeras y de Castilla en la Ciudad de Lima , Perú. *Rev Inv Vet Perú.* 2017;28(3):636-41.
21. Liébana J. Microbiología oral. Segunda. Madrid: McGraw Hill Interamericana; 2002. 1-710 p.
22. Torres J, Romero H. Dosis mínima infectante de la fase micelial de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, en ratones Balb/c. *Rev la Soc Venez Microbiol.* 2011;31(2):144-8.



23. Gangoteno S. Determinación de la presencia de *Hitoplasma capsutatum*, en la paloma común (*Columba livia*) mediante análisis de heces en laboratorio y molecular confirmatorio, en zonas de alta población del área urbana del distrito metropolitano de Quito. Universidad de las Américas de Quito; 2016. Recuperado: <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/5613> en 11/10/2018.
24. Fernández C, Martínez A, Echemendía Y, Martínez G, Perurena M, Illnait M. Sensibilidad in vitro de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* frente a anfotericina B, ketoconazol, itraconazol y fluconazol. Rev Cubana Med Trop. 2003;55(2):76-82.
25. Zúñiga E, León D, Falcón N. Plagas Urbanas: Las palomas y su impacto sobre el ambiente y la salud pública. MV Rev Cienc Vet. 2017;33(1):5-12.
26. Alcalá L, Muñoz P, Peláez T, Bouza E. Aspergillus y aspergilosis. Recuperado: http://www.adiveter.com/ftp_public/articulo782.pdf en 12/03/2019.
27. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Aspergillus fumigatus. 2012;2-3. Recuperado: http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas_de_agentes_biologicos/Fichas/Hongos/Ficha_Asp ergillus_fumigatus.pdf en 17/03/2019.
28. Romero M. Enfermedad pulmonar por *Aspergillus* spp.: distribución de especies y sensibilidad frente a antifúngicos. Universidad Nacional del Nordeste; 2014. Recuperado: <http://repositorio.unne.edu.ar/handle/123456789/466> en 12/03/2019.
29. Latgé J-P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. Clin Microbiol Rev. 1999;12(2):310-50.
30. Kithinji Z. Loop-Mediated Isothermal Amplification Technology: Towards Point of Care Diagnostics. PLOS Neglected Trop Dis. 2012;6(6):1-4.
31. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000;28(12):63-9.
32. Poggi H, Guzmán A, García P, Lagos M. "PCR universal o de amplio espectro": Un aporte a la detección e identificación de bacterias y hongos en la práctica clínica. Rev Med Chil. 2009;137(8):1122-5.



33. Sánchez E, Nina M, Aguirre P, Arce M, Toro N, Vilela R. Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico. Rev Con-Ciencia. 2014;2(1):127-40.
34. Garrido P. Técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle o LAMP . Ventajas en el Diagnóstico Sanitario. Ecuador es Calid Rev científica Ecuatoriana. 2016;3:11-4.
35. Arroyo M, Morales G, Sosa P, Fonseca J, Maestre A. Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP para la detección de Plasmodium: nueva técnica diagnóstica. MÉDUIS. 2008;21(3):158-75.
36. Sánchez Bonastre A. Polymerase Chain Reaction, una revolución en el diagnóstico molecular. Universidad Autónoma de Barcelona.; 2016.
37. Bolano A, Stinchi S, Preziosi R, Bistoni F, Allegrucci M, Baldelli F, et al. Rapid methods to extract DNA and RNA from Cryptococcus neoformans. FEMS Yeast Res. 2001;1(1):221-4.
38. Sheehan D. Physical Biochemistry. Segunda Ed. Ireland: John Wiley & Sons Ltd Wiley-Blackwell; 2009. 282-283 p.
39. Sansinforiano ME, Padilla JA, Hermoso De Mendoza J, Hermoso De Mendoza M, Fernandez-Garcia JL, Martínez-Trancon M, et al. Rapid and easy method to extract and preserve DNA from Cryptococcus neoformans and other pathogenic yeasts. Mycoses. 1998;41(5-6):195-8. DOI: [10.1111/j.1439-0507.1998.tb00323.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1998.tb00323.x)
40. Checa A. Extracción de ADN. Conogasi. 2018. Recuperado: <http://conogasi.org/articulos/extraccion-de-adn-2/> en 27/01/2021.
41. MERCK. Proteinase K. 2020. Recuperado: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/p2308?lang=en®ion=EC> en 27/01/2021
42. Chan K, Liu P, Yang W, Kuo J, Chang C, Wang C. A novel loop-mediated isothermal amplification approach for sex identification of Columbidae birds. Theriogenology. 2012;78(6):1329-38.
43. Nakayama T, Yamazaki T, Yo A, Tone K, Mahdi M, Fujisaki R, et al. Detection of Fungi from an Indoor Environment using Loop - mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method. Biocontrol Sci. 2017;22(2):97-104. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2012.05.034](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.034)



44. Lucas S, Da Luz Martins M, Flores O, Meyer W, Spencer-Martins I, Inácio J. Differentiation of *Cryptococcus neoformans* varieties and *Cryptococcus gattii* using CAP59-based loop-mediated isothermal DNA amplification. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(6):711-4. DOI: [10.1111/j.1469-0691.2009.02919.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02919.x)
45. Donaire K, Pérez A, Romero D, Cárdenas Ó, Álvarez M. Establecimiento y evaluación de dos métodos de pre tratamiento de muestras de suelo para la extracción de ADN para el estudio de la diversidad bacteriana. *Rev Ciencia.* 2017;5(1):11-25.
46. Alejos L, Aragón M, Romero A. Extracción y purificación de ADN. Universidad Nacional Autónoma de México; 2008. 1-26 p. Recuperado: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/extraccion.pdf> en 18/01/2021.
47. Mseddi F, Jarboui M, Sellami A, Sellama H, Ayadi A. A rapid and easy method for the DNA extraction from *Cryptococcus neoformans*. *Biol Proced Online.* 2011;13(5):1-3.
48. Perfect J, Casadevall A. Molecular Biology. En: *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC, USA: ASM Press; 2014. p. 115-44. Recuperado: <http://doi.wiley.com/10.1128/9781555818241.ch5> en 25/09/2020.
49. Sagova M, Cermak L, Novotna J, Plhackova K, Forstova J, Kopecky J. Innovative Methods for Soil ADN Purification Tested in Soils with Widely Differing Characteristics. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(9):2902-7.
50. Castañeda A, McEwen J, Hidalgo M, Castañeda E. Evaluación de varias técnicas de extracción de ADN de *Cryptococcus* spp. a partir de muestras ambientales. *Biomédica.* 2004;24(3):324.
51. Eriksson P, Mourkas E, González-acuna D, Olsen B, Ellström P. Evaluation and optimization of microbial DNA extraction from fecal samples of wild Antarctic bird species. *Infect Ecol Epidemiol.* 2017;7(1):2-5. DOI: [10.1080/20008686.2017.1386536](https://doi.org/10.1080/20008686.2017.1386536)
52. Monroy EX, Fernández CM, Díaz R, Martínez G, Illnait MT, Perurena M. Evaluación de cuatro métodos de extracción del ADN de *Histoplasma capsulatum* y su uso en reacciones de PCR. *2014;23(2):49-56.*



CAPÍTULO VIII: ANEXOS

Anexo 1. Cuadros de resumen de resultados de la evaluación de cantidad, calidad e integridad de material genético con la aplicación de cuatro protocolos a excretas de palomas, evaluación de la viabilidad del ADN obtenido para material genético de palomas, hongos patógenos y *C. neoformans*.

Tabla Nº 15. Resultados obtenidos con excretas secas (ES)

EXTRACTO	PROTOCOLO	MUESTRAS	ESPECTROFOTOMETRÍA		ELECTROFORESIS	INTEGRIDAD	LAMP		
			CONCENTRACIÓN	RATIO 260/280			COLUMBA LIVIA	HONGOS	C. NEOFORMANS
ES	A	1	525,100	1,316	ADN poco fragmentado	-	-	-	-
ES	A	2	520,700	1,313	ADN poco fragmentado	-	-	-	-
ES	A	3	412,150	1,322	ADN poco fragmentado	-	-	-	-
ES	A	4	395,650	1,325	ADN poco fragmentado	-	-	-	-
ES	A	5	382,800	1,323	ADN poco fragmentado	-	-	-	-
ES	A	6	376,700	1,326	ADN poco fragmentado	-	-	-	-
ES	A	7	312,950	1,315	ADN poco fragmentado	-	-	-	-
ES	A	8	391,650	1,313	ADN poco fragmentado	-	-	-	-
ES	A	9	419,200	1,320	ADN poco fragmentado	-	-	-	-
ES	A	10	349,750	1,326	ADN poco fragmentado	-	-	-	-
ES	B	1	614,300	1,330	ADN poco fragmentado	-	-	-	-
ES	B	2	561,600	1,324	ADN poco fragmentado	-	-	-	-
ES	B	3	457,450	1,322	ADN poco fragmentado	-	-	-	-
ES	B	4	449,800	1,329	ADN poco fragmentado	-	-	-	-
ES	B	5	422,100	1,320	ADN poco fragmentado	-	-	-	-
ES	B	6	422,600	1,325	ADN poco fragmentado	-	-	-	-
ES	B	7	291,750	1,328	ADN poco fragmentado	-	-	-	-
ES	B	8	385,900	1,329	Ausente	-	-	-	-
ES	B	9	398,950	1,321	Ausente	-	-	-	-
ES	B	10	417,750	1,335	Ausente	-	-	-	-
ES	C	1	538,550	1,377	Ausente	-	-	-	-
ES	C	2	548,650	1,395	Ausente	-	-	-	-
ES	C	3	377,850	1,376	Ausente	-	-	-	-



ES	C	4	295,050	1,038	Ausente	-	-	-
ES	C	5	360,500	1,385	Ausente	-	-	-
ES	C	6	359,150	1,394	Ausente	-	-	-
ES	C	7	399,500	1,381	Ausente	-	-	-
ES	C	8	346,700	1,388	Ausente	-	-	-
ES	C	9	440,025	1,296	Ausente	-	-	-
ES	C	10	366,463	1,387	Ausente	-	-	-
ES	D	1	598,050	1,423	ADN poco fragmentado	-	-	-
ES	D	2	680,850	1,432	ADN poco fragmentado	-	-	-
ES	D	3	520,050	1,391	ADN poco fragmentado	-	-	-
ES	D	4	434,700	1,409	ADN poco fragmentado	-	-	-
ES	D	5	426,050	1,420	ADN poco fragmentado	-	-	-
ES	D	6	473,850	1,404	ADN poco fragmentado	-	-	-
ES	D	7	442,800	1,426	ADN poco fragmentado	-	-	-
ES	D	8	447,550	1,415	ADN poco fragmentado	-	-	-
ES	D	9	558,413	1,414	ADN poco fragmentado	-	-	-
ES	D	10	447,563	1,414	ADN poco fragmentado	-	-	-

**Tabla Nº 16.** Resultados obtenidos con excretas húmedas (EH).

EXTRACTO	PROTOCOLO	MUESTRAS	ESPECTROFOTOMETRÍA		ELECTROFORESIS	INTEGRIDAD	LAMP		
			CONCENTRACIÓN	RATIO 260/280			COLUMBA LIVIA	HONGOS	C. NEOFORMANS
EH	A	1	24,550	1,289	Integro Integro Integro Fragmentado Integro Integro Integro Integro Integro Integro	-	-	-	-
		2	51,750	1,244			-	-	-
		3	73,100	1,662			-	-	-
		4	4,350	1,337			-	-	-
		5	40,600	1,169			-	-	-
		6	55,950	1,151			-	-	-
		7	52,350	0,822			-	-	-
		8	48,850	1,229			-	-	-
		9	5,100	0,933			-	-	-
		10	79,450	1,846			-	-	-
EH	B	1	39,900	2,074	Integro Fragmentado Fragmentado Fragmentado Fragmentado Integro Fragmentado Fragmentado Fragmentado Fragmentado	-	-	-	-
		2	58,900	2,028			-	-	-
		3	56,500	1,876			-	-	-
		4	222,800	4,382			-	-	-
		5	76,400	6,641			-	-	-
		6	221,150	4,255			-	-	-
		7	107,250	3,285			-	-	-
		8	56,800	2,757			-	-	-
		9	35,750	1,454			-	-	-
		10	37,750	1,695			-	-	-
EH	C	1	71,850	2,148	Integro Fragmentado Fragmentado Fragmentado ADN poco fragmentado ADN poco fragmentado ADN poco fragmentado ADN poco fragmentado ADN poco fragmentado Ausente	-	-	-	-
		2	34,800	1,387			-	-	-
		3	82,700	2,241			-	-	-
		4	8,350	1,428			-	-	-
		5	15,200	1,899			-	-	-
		6	24,100	1,230			-	-	-
		7	13,950	1,082			-	-	-
		8	21,100	2,558			-	-	-
		9	8,600	2,793			-	-	-
		10	14,150	2,670			-	-	-



EH	D	1	68,950	1,256	Integro	-	-	-
EH	D	2	4,650	1,241	Fragmentado	-	-	-
EH	D	3	0,600	1,000	Integro	-	-	-
EH	D	4	0,900	0,714	Integro	-	-	-
EH	D	5	27,900	0,721	Integro	-	-	-
EH	D	6	4,800	1,460	Ausente	-	-	-
EH	D	7	4,450	1,259	Integro	-	-	-
EH	D	8	5,500	0,786	Integro	-	-	-
EH	D	9	81,750	1,996	Ausente	-	-	-
EH	D	10	44,250	1,157	Fragmentado	-	-	-

Anexo 2. Extracción de material genético de sangre de paloma (*Columba livia*) para control de proceso positivo

2.1. Recolección y transporte de muestras de sangre de *Columba livia*

2.1.1 Materiales

2.1.1.1 Materiales de trabajo

Mandil

Guantes de látex descartables

Mascarillas

Gorros

Marcador rotulador de muestras

Tubos eppendorf

Torundas de algodón

Jeringas de 1 ml

Gel refrigerante

Cooler

2.1.1.2 Materiales químicos

Alcohol etílico al 70%

2.1.1.3. Procedimiento

Paso 1. Se tomó 2 muestras de sangre de dos palomas aproximadamente 1ml de sangre de la vena radial del ala con una jeringa de 1ml, la cual fue colocada en dos tubos eppendorf de 2ml estériles.



Paso 2. Para el transporte se utilizó un cooler con gel refrigerante que dio a la muestra un tiempo máximo de 4 horas para su correcta conservación.

Paso 3. Estas muestras se trasladaron al laboratorio Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca en donde se conservaron a temperaturas de refrigeración (4 °C) hasta su posterior procesamiento.

2.1.2. Extracción de ADN control de proceso en sangre de paloma (*Columba livia*)

2.1.2.1. Materiales biológicos

Muestras de sangre de paloma.

2.1.2.2. Materiales químicos

Buffer de lisis 0.2 mL (8 mM de EDTA, 200 mM NaCl, pH 8.0 y 40 Mm Tris-HCL, 2 % de SDS (Sigma, No. cat.: T4661, 320331, 53014, EDS y 71725))

Solución de proteinasa K (10mM Tris-HCL, pH 8.0, 1mM de EDTA, 50% de glicerol, 5 mg/ml de proteinasa K (Sigma, No. cat.: T4661, 320331, EDS; G5516 y Fisher bioReagents, Cat. no: BP1700:)

Solución de fenol/cloroformo/A. isoamílico 25:24:1 (Sigma, No. cat.:77619)

Solución de etanol absoluto (Sigma, No. cat.: E7148)

Solución de etanol al 70% (Sigma, No. cat.: E7148 y W4502).

2.1.2.3. Equipos e insumos

Micropipetas de diferentes volúmenes y sus puntas

Tubos eppendorf de diferentes volúmenes

Baño María

Centrifuga

Vortex



2.1.2.4. Procedimiento

Paso 1. La muestra de sangre completa (1ml) fue centrifugada a 2000 x g por 10 min a 4°C.

Paso 2. Se tomó 200 µl de capa flogística y se le agregó 200 µl de solución de buffer de lisis y 40 µl de la solución de proteinasa K, para tener un total de 440 µl.

Paso 3. Esta mezcla se colocó a baño María por 12 h a una temperatura de 56 °C, posteriormente se le agregó 440 µl de la solución de fenol/cloroformo/A. isoamílico 25:24:1 y fueron mezcladas con la ayuda de un vortex por 10 a 15".

Paso 4. La mezcla fue centrifugada a 14,000 x g por 10 min, posterior a lo anterior se observó que la solución se separó en dos partes, la inferior que corresponde a la mezcla de solventes y la superior acuosa.

Paso 5. Se tomó 350 µl de la parte acuosa o sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo, al cual se le agregó 875 µl de etanol absoluto frío (4 °C).

Paso 6. Ambas soluciones se mezclaron por inversión y se sometieron a centrifugación a 14,000 x g por 10 min para formar la pastilla de los ácidos nucleicos totales, posterior a la centrifugación se decantó el sobrenadante.

Paso 7. Al precipitado o pastillas del tubo se le agregó 500 µl de la solución de etanol al 70% fría (4 °C), se lavó la superficie del tubo por inversión y posteriormente se volvió a centrifugar en las condiciones arriba descritas.

Paso 8. El sobrenadante se decantó nuevamente y el precipitado con el ADN total se dejó secar a temperatura ambiente durante 12 h protegido del polvo y la luz directa.



2.1.3 Evaluación de la viabilidad del material genético obtenido de la muestra de sangre (control de proceso) para ser amplificado mediante ensayo LAMP

2.1.3.1. Materiales biológicos

Muestra de ADN total extraído de la muestra de sangre de paloma.

2.1.3.2 Materiales químicos o reactivos

Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. No.: W4502)

Oligonucleótidos para detección de material genético de las palomas (*Columba livia*) (42):

Col-FIP (F1c + F2):

TGGGGTTAACGGGTTACCCTGACTGGCTCAGCTTGTGC

Col-BIP (B1c + B2):

TTCGTGATGGGGATCGGGGAGAGCTTATGACCCGCACTT

Col-F3: CCTTAGATGTCCGGGGCT

Col-B3: GGCAGGGACTTAATCACCGC

Reacción buffer 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8.8 a 25°C; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 10 mM KCl; 2 mM MgSO₄; 0.1% Triton X-100).

Bst ADN polimerasa.

dNTP's (10 mM c/u).

2.1.3.3. Equipos e insumos

Micropipetas (10, 100 y 1000 µl) con sus respectivas puntas.

Microtubos eppendorf de diferentes volúmenes.

Microtubos de PCR.

Nanocentrífuga.

Termociclador (Mastercycler® nexus gradien thermal cycler, Eppendorf) o baño María.

Transiluminador.

Fotodocumentador (Gel Documentation System, BioRad).

Computadora de escritorio.



2.1.3.4. Procedimiento

Para evidenciar la viabilidad del material genético obtenido de la muestra de sangre de paloma, el ensayo se realizó, con el grupo de oligonucleótidos o primers específicos para ADN de paloma, siguiendo el siguiente procedimiento.

Paso 1. Previo a realizar el ensayo de amplificación LAMP se procedió a descongelar la muestra de ADN total extraído de la muestra de sangre y los reactivos necesarios.

Paso 2. Posteriormente se realizó una premezcla para el ensayo de amplificación LAMP para detección de ADN del material genético deseado (palomas) con el volumen requerido para la muestra a analizar (12.5 µl de volumen final por reacción) colocando en el siguiente orden los reactivos exceptuando las muestras de ADN total.

Tabla Nº 17. Reactivos para el ensayo de amplificación LAMP para el control positivo.

Reactivos	Concentración		Volumen por reacción*
	Inicial	Final	
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	6.1 µl
Buffer de amplificación 10X	10X	1X	1.25 µl
Betaína	4 M	800 mM	2.5 µl
dNTP`s	10 mM c/u	0.28 mM	0.35 µl
Oligonucleótido correspondiente FIP	100 µM	1.6 µM	0.2 µl
Oligonucleótido correspondiente BIP	100 µM	1.6 µM	0.2 µl
Oligonucleótido correspondiente F3	25 µM	0.2 µM	0.1 µl
Oligonucleótido correspondiente B3	25 µM	0.2 µM	0.1 µl
Muestra de ADN total	--- µg/µl	--- µg/µl	3 µl
Volumen final	-----	-----	12 µl

*n= número de muestras.



Paso 3. La premezcla preparada se llevó al vortex por 4 a 6", y se colectó por centrifugación (nanocentrífuga) a máxima velocidad durante 15 a 20".

Paso 4. Se marcó el tubo de PCR (200 µl), se colocó 9 µl de la premezcla, y se les adicionó 3 µl de la muestra de ADN total correspondiente.

Paso 5. Los tubos con las reacciones de amplificación (12 µl) se colocaron en el baño María/termociclador para la incubación de esta premezcla con el fin de que suceda la desnaturización y el alineamiento:

Tabla Nº 18. Tiempo y temperatura para la desnaturización y alineamiento para el control positivo.

Paso	Desnaturalización	Alineamiento
Tiempo (min', s'')	5 '	5 '
Temperatura (°C)	94°C	4°C

Paso 6. Culminado ese tiempo, se sacó el tubo de PCR (200 µl) del baño María/termociclador y se añadió la enzima para que suceda la extensión y la inactivación:

Tabla Nº 19. Concentración de Enzima *Bsm* ADN polimerasa para el control positivo.

Reactivo	Concentración		Volumen por reacción
	Inicial	Final	
Enzima <i>Bsm</i> ADN polimerasa	8 U/ µl	0.32 U/ µl	0.5 µl
Volumen final:	----	---	12.5 µl

Paso 7. Posteriormente se sometió esta mezcla al proceso de extensión e inactivación en el baño María/termociclador.

Tabla Nº 20. Tiempo y temperatura para la extensión e inactivación del control positivo.

Paso	Extensión	Inactivación
Tiempo (min', s'')	60 '	10 '
Temperatura (°C)	60°C	80°C



2.1.3.5. Detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con bromuro de etidio

Para la detección de los productos de amplificación de los ensayos LAMP se realizó su resolución mediante electroforesis en geles al 1.5% de agarosa-TAE teñidos con bromuro de etidio, se consideró una reacción de amplificación positiva si es observado el patrón de múltiples de fragmentos (escalera) esperados.

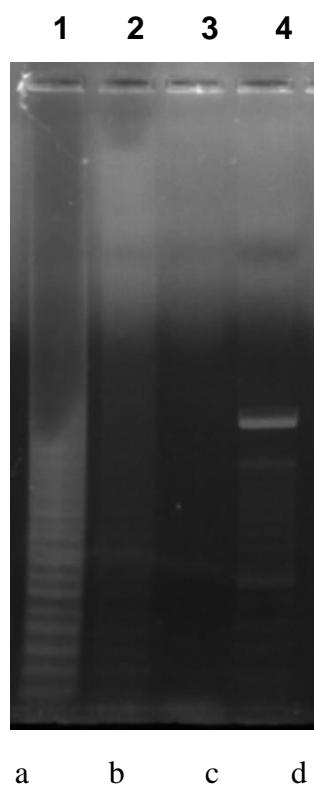


Figura 7. Control de proceso en sangre de *Columba livia*; (a) y (b) control positivo (+) en sangre de *Columba livia*, (c) control negativo (-), y (d) marcador de peso molecular.



Anexo 3. Resultados de Integridad obtenidos con los cuatro protocolos con ES y EH.

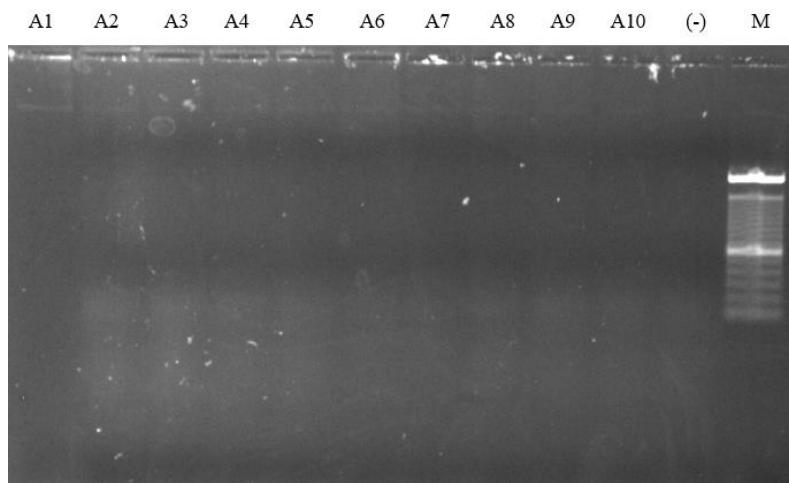


Figura 8. Evaluación de la integridad del Protocolo A de las muestras de excretas secas con ADN poco fragmentado.

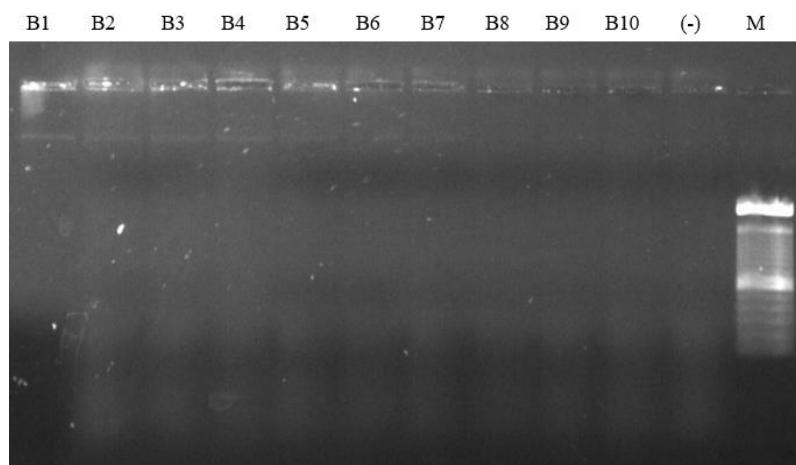


Figura 9. Evaluación de la integridad del Protocolo B de las muestras de excretas secas, (B1, B2, B3, B4, B5, B6 y B7) ADN poco fragmentado y (B8, B9 y B10) ADN ausente.



C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 (-) M

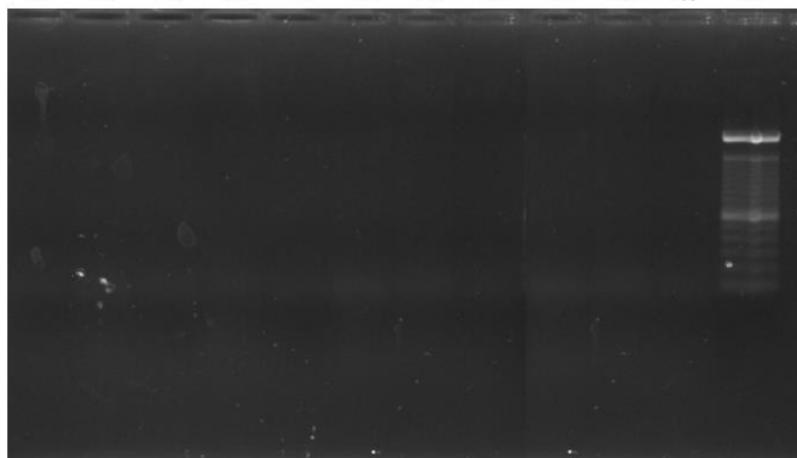


Figura 10. Evaluación de la integridad del Protocolo C de las muestras de excretas secas con ADN ausente.

D1 D2 D3 D4 D5 D6 D7 D8 D9 D10 (-) M

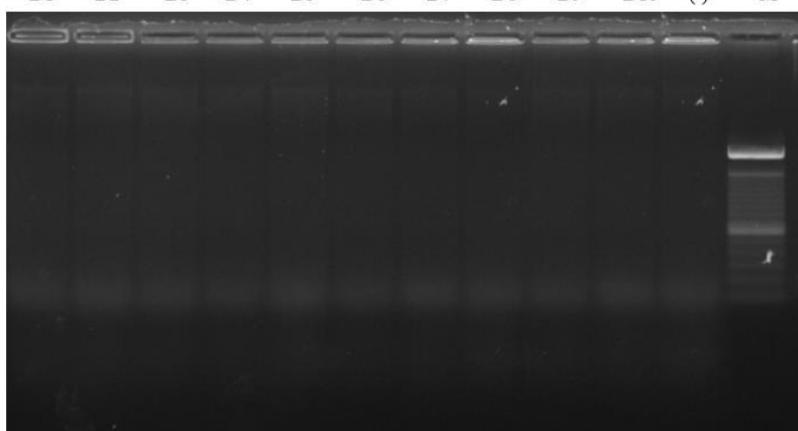


Figura 11. Evaluación de la integridad del Protocolo D de las muestras de excretas secas con ADN ausente.

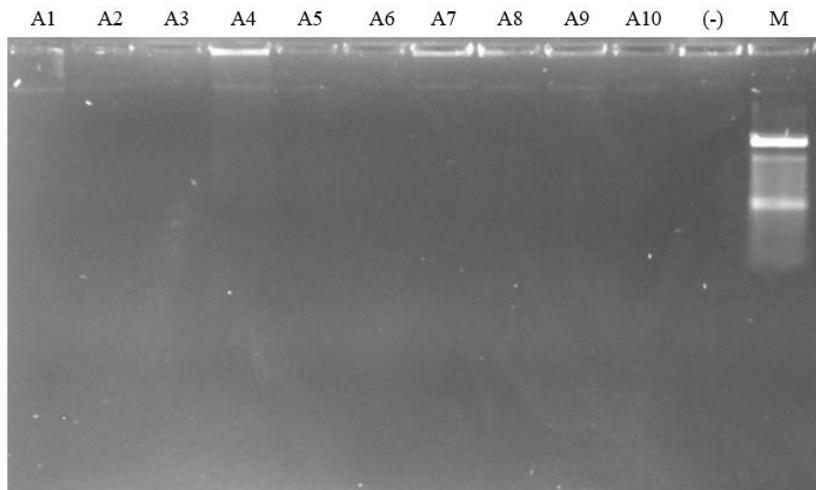


Figura 12. Evaluación de la integridad del Protocolo A de las muestras de excretas húmedas, (A1, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9 y A10) ADN íntegro y (A4) ADN fragmentado.

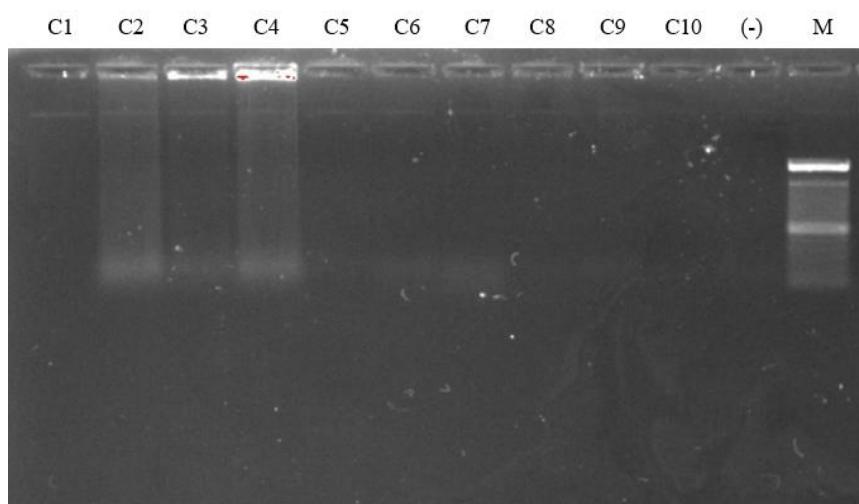


Figura 13. Evaluación de la integridad del Protocolo C de las muestras de excretas húmedas, (C1) ADN íntegro, (C2, C3, C4) ADN fragmentado, (C5, C6, C7, C8 Y C9) ADN poco fragmentado y (B10) ADN ausente.



D1 D2 D3 D4 D5 D6 D7 D8 D9 D10 (-) M

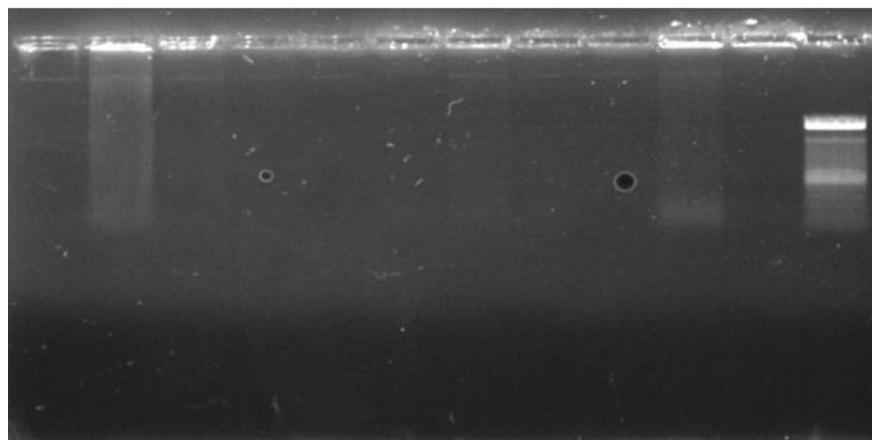


Figura 14. Evaluación de la integridad del Protocolo D de las muestras de excretas húmedas, (D1, D3, D4, D5, D7 y D8) ADN íntegro, (D2 y D10) ADN fragmentado y (D6 y D9) ADN ausente.

Anexo 4. Resultados obtenidos del ANOVA de concentración de ADN total y el ratio 260/280.

Tabla Nº 21. Cuadro de Análisis de la varianza de la concentración (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3165575.48	7	452225.07	105.66	<0.0001
Protocolo	39730.42	3	13243.47	3.09	0.0322
Extracto	3074598.83	1	3074598.83	718.36	<0.0001
Protocolo*Extracto	51246.23	3	17082.08	3.99	0.0109
Error	308159.70	72	4280.00		
Total	3473735.18	79			

Tabla Nº 22. Cuadro de Análisis de la varianza de Ratio 260/280 (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	27.64	7	3.95	9.50	<0.0001
Protocolo	10.72	3	3.57	8.60	0.0001
Extracto	5.06	1	5.06	12.19	0.0008
Protocolo*Extracto	11.85	3	3.95	9.51	<0.0001
Error	29.92	72	0.42		
Total	57.56	79			



Anexo 5. Resultados obtenidos de la prueba de Chi Cuadrado de Pearson en la interacción protocolo e integridad y extracto e integridad.

Tabla Nº 23. Chi Cuadrado Pearson de la interacción Protocolo-Integridad.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	37.15	9	<0.0001
Chi Cuadrado MV-G2	37.35	9	<0.0001
Coef.Conting.Cramer	0.34		
Kappa (Cohen)	0.03		
Coef.Conting.Pearson	0.56		

Tabla Nº 24. Chi Cuadrado Pearson de la interacción Extracto-Integridad.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	53.38	3	<0.0001
Chi Cuadrado MV-G2	67.72	3	<0.0001
Coef.Conting.Cramer	0.58		
Coef.Conting.Pearson	0.63		

Anexo 6. Toma de muestras de excretas secas.





Anexo 7. Toma de muestras de excretas húmedas.



Anexo 8. ADN total obtenido de excretas secas.





Anexo 9. ADN total obtenido de excretas húmedas.

