

## Sub área: 6-Diagnóstico y Control

### Comparación entre diferentes PCRs para la detección molecular de *Leptospira* spp.

Sarullo Vanina, Hamer Micaela, Watanabe Olivia, Grune Loffler Sylvia, Brihuega Bibiana, Martínez Mara.

Laboratorio de Leptospirosis. Instituto de Patobiología- UEDD IPVET INTA CONICET, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Nicolás Repetto y de los Reseros s/n, Buenos Aires, Hurlingham, B1686, Argentina.

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica con gran potencial epidémico. La misma puede presentarse con una amplia variedad de manifestaciones clínicas desde una forma leve o grave, e incluso fatal si no es detectada a tiempo. En las últimas décadas, la detección del ADN leptospiral por PCR, ha tomado gran importancia por su alto poder discriminatorio, reproducibilidad y fácil interpretación.

El objetivo de este trabajo fue comparar 4 PCRs de tiempo final, con el fin de evaluar su aplicación para la detección del ADN leptospiral de especies patógenas. Las PCRs utilizadas fueron las dirigidas a los genes *lipI32*, *secY/flaB*, *ligBpet* y *ligBct*.

Para la estandarización de las pruebas moleculares se usó un total de 17 cepas de leptospirosis patógenas de las especies *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii* y *L. kirschneri*; 2 cepas intermedias de las especies *L. fainei* y *L. licerasiae*, y 1 cepa no patógena de la especie *L. biflexa*, pertenecientes a la colección del Laboratorio de Leptospirosis de INTA Castelar (Centro de referencia de la OIE), Buenos Aires, Argentina.

Los cultivos se mantuvieron durante 7-10 días a 30°C en medio EMJH. La extracción del ADN leptospiral se llevó a cabo utilizando 20µL del cultivo y 150µL de resina Chelex-100. Se incubó a 56°C durante 20 min y a 100°C durante 8 min. Finalmente se preservó a -20°C hasta su uso. Cada PCR fue llevada a cabo según los protocolos estandarizados. El análisis de la integridad del ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en *buffer* TAE 1x.

El tamaño del amplicón de cada PCR fue estimado utilizando un marcador de 100pb. La corrida se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 1h a 90v.

La detección del ADN leptospiral de las cepas patógenas fue del 100% en todas las PCRs. No se obtuvo amplificación en las especies saprófitas e intermedias utilizadas en el ensayo. Además, en este ensayo se utilizaron 2 PCRs desarrolladas en nuestro laboratorio, dirigidas a diferentes regiones del gen *ligB* (*ligBpet* y *ligBct*), con el fin de observar la concordancia de los resultados con las PCRs dirigidas a los genes *lipI32* y *secY/flaB*, comúnmente utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad.

Si bien las 4 PCRs, han logrado detectar los genes de especies patógenas en las cepas utilizadas, es importante remarcar que las PCRs de diagnóstico deben ser específicas para evitar llevar a falsos positivos ante el diagnóstico en casos sospechosos de leptospirosis. También es necesario destacar la importancia del desarrollo y actualización de nuevos métodos de detección molecular usados para el diagnóstico en muestras clínicas de esta especie tan divergente.

Palabras claves: leptospirosis, diagnóstico molecular, genes de virulencia, salud pública.

Agencia de Financiamiento: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA-Castelar) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)