

Area de Beca: CM - Cs. Médicas**Título del Trabajo:** IDENTIFICACIÓN DE LEPTOSPIRAS EN MUESTRAS DE AGUA MEDIANTE LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE PCR CONVENCIONAL**Autores:** ALEGRE, ELSA A.; RAMIREZ, NATALIA N.; RUIZ, RAQUEL M.**E-mail de Contacto:** agustina_ea@hotmail.com**Teléfono:****Tipo de Beca:** UNNE Perfec. Tipo B**Resolución N°:** 086/2015**Período:** 01/01/2015 - 29/02/2016**Proyecto Acreditado:** B002-2014. Detección de infección natural de diferentes especies de leishmanias y leptospirosis en muestras de animales no domesticas mediante técnicas de biología molecular.
01/01/2015-31/12/2018. Resolución 155/2015 C.S.**Lugar de Trabajo:** Facultad de Cs. Veterinarias**Palabras Claves:** Leptospiras-Filtración- PCR**Resumen:**

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial, causada por diversos serovares de leptospirosis. El hombre puede adquirir la enfermedad al estar en contacto directo con orina de animales infectados con la bacteria o indirectamente con aguas y suelos contaminados con la orina de estos animales. Por muchos años fue considerada una enfermedad vinculada con actividades ocupacionales que permiten el contacto con fuentes o vehículo de transmisión, actualmente este concepto ha cambiado, al observarse en personas alejadas a ocupaciones específicas como amas de casa, niños, estudiantes, profesionales y turistas. La detección de este patógeno por métodos convencionales a partir de fuentes de agua ha demostrado ser una metodología tediosa y complicada. Hecho atribuible, al menos en parte, al tiempo que requiere en medios de cultivo o el crecimiento de microorganismos de morfología similar, lo que dificulta el aislamiento de los mismos. Por esa razón, han surgido técnicas moleculares que permiten superar estas limitaciones ofreciendo resultados con un alto grado de sensibilidad y de fácil reproducibilidad. El objetivo del presente estudio fue aislar e identificar *Leptospira* en fuentes de agua de la zona ribereña de la ciudad de Corrientes. Las muestras de agua fueron recolectadas en frascos estériles y transportadas refrigeradas al laboratorio de la Cátedra de Salud Pública de la Facultad de Ciencias Veterinarias donde se procedió a la medición de pH de las mismas. Seguidamente, las muestras fueron sometidas a filtración mediante metodología adaptada por nuestro equipo de trabajo, consistentes en el pasaje de las muestras por filtros de 0,45µm y 0,22µm. En muestras con un alto grado de turbidez, se efectuó un centrifugado previo al filtrado de modo tal de poder separar las impurezas más groseras, mejorando el proceso de filtrado, paso siguiente se procedió como se mencionó anteriormente. Se emplearon como muestra para el diagnóstico por PCR los filtros de 0,22µm. Los mismos fueron seccionados en forma estéril y colocados en tubos Eppendorf y almacenados a -20°C hasta la extracción del ADN. La técnica de extracción de ADN requirió como paso previo la hidratación de los filtros con solución STE buffer. A continuación se retiraron los filtros y la solución bufferada fue centrifugada a 12000 rpm durante 4' luego del cual se descartó el sobrenadante. El sedimento restante fue sometido a extracción con detergente CTAB. Esta técnica se basa en una serie de lavados con soluciones de homogenización- cloroformo:alcohol isoamílico- alcohol isopropílico- etanol 70% alternados con procesos de centrifugados. El pellet obtenido fue resuspendido en 20µl de agua destilada estéril y almacenada a 4°C hasta su procesamiento. Se analizó una porción del gen que codifica para ARN ribosomal 16S, empleándose primers cuyo producto final de amplificación en un volumen de 25µl dieron fragmentos de 430pb. Así mismo, se ensayaron reacciones conteniendo 1x de Buffer de PCR, 1,5mM de MgCl₂, 20mM de cada dNTPs, 1,0mM de cada primers y 1,0U de Taq DNA polimerasa. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 5', seguida de 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C 1', hibridación a 55°C por 30' y extensión a 72°C por 1') y una extensión final a 72°C por 7' e incubación final a 4°C. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa teñidos con Bromuro de Etidio y visualizados por transiluminación UV. De un total de 30 muestras de ADN extraído a partir de los filtros de agua, 2 de ellas revelaron bandas de 430 pb detectables a leptospirosis. Para las reacciones de PCR se emplearon controles positivos a partir de *L. Icteroahemorrhagiae*, cultivos provenientes del Instituto de Patobiología, INTA Castelar (Buenos Aires). En Argentina pocos son los reportes de aislamiento de Leptospiras, a partir de muestras de agua, probablemente vinculado a la alta contaminación que presentan las muestras y su complejidad en el aislamiento. El empleo de un sistema de filtración como paso previo a la realización de técnica de PCR demostró ser un método práctico y eficaz que permite eliminar las impurezas más groseras y retener las espiroquetas en estudio. Así mismo, los resultados obtenidos a partir de PCR convencional confirman la existencia de especies de *Leptospira* en el área de estudio, aportando un gran avance en la epidemiología de este microorganismo y el desafío de implementar técnicas de PCR dirigidas a la identificación de especies patógenas.