

Área de Beca: CM - Cs. Médicas

Título del Trabajo: IDENTIFICACIÓN DE LEPTOSPIRAS PATÓGENAS A NIVEL DE ESPECIE EN QUIRÓPTEROS COLECTADOS EN LA CIUDAD DE CORRIENTES.

Autores: RAMIREZ, NATALIA N.- ALEGRE, ELSA A.- RUIZ, RAQUEL M.

E-mail de Contacto: natyramirez13@hotmail.com

Teléfono:

Tipo de Beca: UNNE Perfec. Tipo B Resolución N°: 086/15 CS Período: 01/03/2015 - 29/02/2016

Proyecto Acreditado: B002-2014. Resolución N° 155/15 CS. Detección de infección natural de diferentes especies de Leishmania y Leptospiras en muestras de animales no domésticos mediante técnicas de biología molecular. Acreditada por la Secretaría General de Ciencia y Técnica. Período 01/01/2015 - 31/12/2018.

Lugar de Trabajo: Facultad de Cs. Veterinarias

Palabras Claves: *Leptospiras* sp., murciélagos, PCR

**Resumen:**

El año 2008 se agrupó a las Leptospiras en genoespecies saprófitas, patogénicas y de comportamiento intermedio. Las genoespecies patogénicas comprenden 8 especies. En su membrana externa se han identificado proteínas: *OmpL*, *LipL* y *Lig*, entre otras. Para un proyecto anterior, se capturaron murciélagos en la ciudad de Corrientes y mediante la reacción de PCR fue posible detectar Leptospiras en diferentes especies de quirópteros, aquí surge la necesidad de identificar especies de bacterias que fueron anteriormente clasificadas como patógenas o no patógenas, para ello se plantearon los siguientes objetivos: establecer las condiciones PCR para identificar especies *Leptospiras* sp. y aplicar las técnicas de PCR para detectar especies de Leptospiras en las muestras de tejido renal de quirópteros en las que se detectó previamente ADN de leptospiras patógenas cuyo ADN se hallaba debidamente acondicionado hasta su utilización. Los cultivos fueron examinados con el microscopio de campo oscuro a fin de evaluar: presencia de leptospiras, movilidad, contaminación y estado general del medio. Luego la extracción de ADN de las bacterias se ejecutó a partir de cultivos bacterianos de: *L. interrogans* serogrupos Icteroahemorrágiae y serogrupo Canícola; *L. Borgpeterseni* serogrupos tarasovi; *L. Kirschneri* serogrupos cynopteri. Todas adquiridas del Instituto de Patobiología, INTA Castelar (Buenos Aires). La digestión fue realizada con detergente CTAB y por el método de hervido (boiling). Se seleccionaron 2 bacterias de circulación frecuente en nuestra región (*L. interrogans* y *L. borgpeterseni*) y una especie cuyo hallazgo fue documentado en murciélagos de otros países (*L. Kirschneri*). Para el escaneo de los controles bacterianos se amplificó parte de los genes *LipL32*. Para el análisis de especies patógenas se analizaron genes *OmpL1*, los 4 primers seleccionados (*OmpL1* intergroup A, 396pb; *OmpL1* Intergroup B, 406 pb; *OmpL1* Borgpeter, 389 pb; *OmpL1* Kirschner, 389 pb), permiten diferenciar especies de Leptospiras patógenas y el programa de ciclado empleado fue el descripto por Reitstetter (2006). Existe una divergencia del gen, que divide a *L. interrogans* en dos grupos, por lo que fue necesario realizar 2 PCR sencillas para identificar una sola especie. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa 2% en buffer TBE1X, teñidos con bromuro de etidio, utilizando un marcador de peso molecular (cienmarker) y visualización por transiluminación UV. En el escaneo de los controles bacterianos, mediante análisis del gen *LipL32*, se visualizó bandas de amplificación de 474 pb según lo esperado, con diferentes intensidad de banda, la nitidez fue sobresalientes en *L. interrogans* y *L. Borgpeterseni*, en cambio *L. Kirschneri* demostró banda de amplificación tenue. Posteriormente, en el análisis del gen *OmpL1* para identificar *L. interrogans* y *L. Borgpeterseni* a partir de los cultivos bacterianos a fin de establecerlos como controles positivos, reveló bandas de amplificación nítidas y de buena intensidad en los controles cuyo ADN se obtuvo con detergente CTAB. Seguidamente, esta técnica fue aplicada a las 16 muestras de murciélagos que habían resultado detectables para leptospiras patógenas. Se inició la prueba, para detectar *L. interrogans* del grupo A, luego el grupo B, a continuación la PCR para detectar *L. Borgpeterseni*. Todas se consideraron como no detectables para ambas especies de leptospiras, en todos los casos se observaron bandas de amplificación en los controles positivos y ausencia de banda en el control negativo. La reacción para detectar *L. Kirschneri* no fue realizada aun, debido a que se evidenció ADN de baja calidad, la visualización en microscopio de campo oscuro fue escasa con detección de 2 leptospiras circulantes. Estos resultados indican que las especies patógenas detectadas en los ejemplares colectados no pertenecen a las especies de *L. interrogans* ni a *L. Borgpeterseni*, queda pendiente realizar la detección por biología molecular de la especie *L. Kirschneri*. Trabajos realizados en Australia, Perú, catalogan a los quirópteros como posibles reservorios de leptospiras, sin embargo en Brasil y Estados Unidos sostienen que no son importantes, aunque ya es conocido que los murciélagos pueden jugar un papel en la transmisión, aquí aun queda trabajo por hacer para lograr encontrar las especies que circulan en los quirópteros de nuestra región.