

Area de Beca: CM - Cs. Médicas

Título del Trabajo: **OPTIMIZACION DE TECNICA DE EXTRACION DE ADN Y PCR SIMPLES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE LEPTOSPIRAS PATÓGENAS Y SAPRÓFITAS EN FUENTES DE AGUA**

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

E-mail de Contacto:

Teléfono:

Tipo de Beca: UNNE Perfec. Tipo B

Resolución Nº: 033/13

Período: 01/03/2013 - 01/03/2015

Proyecto Acreditado: 2010-B0088 "Roedores como reservorios de leptospiras y leishmania y presencia de leptospiras en fuentes de agua en zona ribereña". Secretaria General de Ciencia y Tecnica, Universidad Nacional del Nordeste. 2011-2014

Lugar de Trabajo: Facultad de Cs. Veterinarias

Palabras Claves: Técnicas-Leptospiras-Agua

#### Resumen:

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial que afecta al hombre y los animales. Es producida por serovares de *leptospiras patógenas*. La transmisión puede darse en forma directa por contacto con orina u otro material procedente de los animales infectados con la bacteria, o indirectamente con aguas y suelos contaminados con la orina de estos animales. La detección de este patógeno para el análisis de riesgo y epidemiología empleando fuentes de agua por métodos convencionales ha demostrado ser una metodología tediosa y complicada. Esto se debe principalmente al tiempo que requiere el cultivo o el aislamiento de los patógenos. Por esa razón, han surgido técnicas moleculares que permiten identificar patógenos mediante la detección de sus ácidos nucleicos, no obstante, la detección de microorganismos a partir de estas muestras por técnica de PCR, depende inicialmente del buen protocolo de extracción de ADN a partir del cual se implementará la reacción de PCR en sí. El presente trabajo tuvo como objetivo establecer un protocolo de extracción de ADN y técnicas de PCR simples, empleando dos pares de primers dirigidos a los genes LipL32 y ARN ribosomal 16s con el fin de identificar molecularmente especies saprofitas y patógenas de leptospiras a partir de muestras de agua. Para el desarrollo de este trabajo, se procedió a realizar el filtrado de las muestras de agua empleando filtros de 0,45µ y 0,22µ de porosidad. En aquellas situaciones donde las muestras eran muy turbias, se instauró como paso previo su centrifugado. En la extracción de ADN se ensayaron dos métodos de recuperación de material consistentes en el uso de agua destilada o solución buffer con posterior centrifugado y obtención de submuestras (sobrenadante y sedimento), evaluando cual de las submuestras y cual medio líquido logrará una mayor recuperación de leptospiras. Estas muestras fueron sometidas a Extracción de ADN con detergente CTAB, aplicándose como variante del protocolo original, el análisis de todas las interfases que aparecieran. A modo de evaluar el funcionamiento del Sistema de filtrado y constatar el grado de eficiencia y sensibilidad de la técnica de Extracción de ADN, se realizó el sembrado de cepas de leptospiras en muestras de aguas, las que serían posteriormente empleadas como controles positivos de técnica. Por último, para identificar la presencia de material genético de especies de leptospiras, se emplearon dos pares de iniciadores previamentes descriptos analizando secuencias dirigidas a los genes LipL32 y ARN ribosomal 16s en forma individual, obteniéndose luego de su amplificación en un volumen de 25 µl fragmentos de 430 pb cuando se trataba de L. saprofitas y 474 pb cuando se trataba L. patógenas. Los productos de PCR fueron separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X, teñidos con Bromuro de etidio y visualizados por transiluminación UV. Como controles positivos de la PCR se empleó ADN procedentes de cultivos de referencia de L. patógenas y saprofitas y un control negativo consistente en agua destilada. Los ensayos de filtración realizados tanto en aguas sembradas con cepas de leptospiras como en muestras de aguas presentaron buena retención de impurezas (filtros de 0,45 µm) y células microbianas. En cuanto a la técnica de extracción de ADN al revelado se pudo observar que aquellas muestras obtenidas a partir de solución buffer revelaban bandas más nítidas, arrojando líneas de mayor intensidad cuando el material de partida procedía del sedimento. En todas las experiencias realizadas, se obtuvieron bandas de 430 pb para L. apatógenas y 474 pb para L. patógenas, por lo que se logró optimizar todos los parámetros que se requieren en la metodología de filtrado de muestras de agua y obtención de ADN. La complejidad del ciclo de vida de este patógeno implica la necesidad de un manejo epidemiológico que incluya la identificación y detección de la bacteria no solo en sus reservorios sino también en fuentes de agua. La optimización de una técnica rápida y eficiente como lo es la PCR colaborará en un mejor manejo en la vigilancia epidemiológica.

Becario  
(Firma)

Co-Autor  
(Firma)

Co-Autor  
(Firma)

Director de Beca  
(Firma y Aclaración)

Director de Proyecto  
(Firma y Aclaración)

Control: 23qc44e0p