

Sub-área: Diagnóstico y control

Aplicación de la técnica LAMP para la detección de ADN leptospiral con una enzima producida en Argentina

Hamer, Micaela; Watanabe, Olivia; Saraullo, Vanina; Ortega, Facundo; Martinez, Mara; Sánchez, Cristina; Brihuega, Bibiana; Grune Loffler, Sylvia.

Laboratorio de Leptospirosis, Instituto de Patobiología Veterinaria-IPVET, UEDD INTA-CONICET, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

La leptospirosis animal es una importante enfermedad zoonótica considerada endémica en Argentina, con brotes estacionales en la época de otoño y primavera, lo cual representa un gran riesgo económico a nivel productivo. El diagnóstico molecular de leptospirosis mediante la técnica de Amplificación isotérmica mediada por Loops (LAMP) tiene la ventaja de ser rápido, sensible y específico, con una fácil interpretación de resultados cuando se combina con indicadores colorimétricos. Por otro lado, resulta ser más económica que las técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencionales, RT-PCR y q-PCR, ya que se lleva a cabo a temperatura constante, evitando el uso de equipamiento costoso. Teniendo esto en cuenta, se puso a punto y se estudió la sensibilidad analítica de la técnica de LAMP para la detección de ADN leptospiral en muestras animales, utilizando la enzima BFo ADN polimerasa isotérmica de producción nacional (PB-L, Productos Bio-Lógicos, Argentina), combinándola con diferentes colorantes: Azul de Hidroxinaftol (AHN) y Calceína/ Mn^{2+} . La mix de LAMP se preparó a un volumen final de 25 μ L utilizando tres pares de primers cuyo target es la región 16S ARNr de leptospirosis patógenas con las siguientes condiciones: 3,2 μ M primers FIP/BIP y FL/BL; 1 μ M primers F3/B3; 1X buffer; 5mM $MgSO_4$; 5U BFo ADN Polimerasa y 1M betaína. La incubación fue de 60min a 66°C. Para los ensayos se realizaron diluciones seriadas de ADN de *L. interrogans* serovar Pomona Pomona extraído con resina Chelex-100 y agua pura como control negativo. Luego de la reacción, se obtuvo amplificación hasta 10pg de ADN utilizando 120 μ M de AHN, observándose color violeta en los tubos negativos y color rosado o azul en los positivos. Con 100 μ M Calceína/ 0,5mM Mn^{2+} se obtuvieron resultados positivos (color amarillo) hasta 1pg de ADN, mientras que los tubos negativos se vieron de color naranja. La amplificación fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. La sensibilidad de LAMP usando Calceína como indicador presentó mayor sensibilidad respecto al uso de AHN y, además, resultó ser más sensible que PCR *lipL32*, con la cual se obtuvo un límite de detección de 10pg de ADN. La técnica de Lepto-LAMP aquí descrita es el comienzo del desarrollo de un nuevo kit para el screening de leptospirosis animal en la región, de manera rápida, sencilla y de bajo costo, ya que adopta una enzima producida en el país.

Palabras clave: leptospirosis, diagnóstico molecular, LAMP, ADN, indicadores, sensibilidad.

Agencias financiadoras: Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT) de la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo tecnológico y la Innovación (PICT Start-Up 2016-4815).