

INFORME DE AVANCE

BECA DE INICIACION

2012

**DETERMINACIÓN DE PRESENCIA DE LEPTOSPIROSIS EN DIFERENTES
FUENTES DE AGUA Y EN ROEDORES QUE HABITAN ZONA CARENCIADA
DE LA PROVINCIA DE CORRIENTES.**

Becaria de Investigación en Iniciación-Categoría B: Alegre Elsa Agustina

Otorgada por Secretaria General de Ciencia y Técnica según Resolución N° 930/09

Facultad: Ciencias Veterinarias.

Directora: Dra. Ruiz, Raquel M.

1-EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA.

Dentro de las actividades desarrolladas en el presente periodo, se logró efectuar la captura de 77 ejemplares de roedores los que fueron identificados y clasificados dentro de las especies *Rattus rattus* y *Mus musculus*. Los datos obtenidos se registraron en fichas identificatorias que servirán para el análisis estadístico de los animales muestreados. Los animales capturados fueron trasladados al laboratorio de la Cátedra de Salud Pública de la Facultad de Ciencias Veterinarias para su posterior procesamiento. El diagnóstico de leptospirosis se llevó a cabo mediante técnicas de cultivo y de biología molecular (PCR). El número de muestras leídas por microscopia de campo oscuro fue de 70 tubos de cultivo, de los cuales 60 de los mismos se les efectuó las lecturas desde el día 21 de cultivo hasta completado los 6 meses, arrojando positivos dos cultivos. Con respecto a la técnica de PCR, se logró poner a punto la técnica para leptospirosis, sus controles y para la especie rata, actividades que se realizaron en el Servicio Veterinario de Biología Molecular. Los resultados fueron presentados en la “XVIII Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste 2012” organizada por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNNE. Así mismo, estos resultados fueron publicados en 2 artículos científicos en Revista Veterinaria (Con índice de impacto, The SCImago Journal & Country Ranks) Facultad de Ciencias Veterinarias ISSN- 1668-4834 (en prensa) y 2 Manuscritos en realización.

2-GRADO DE CUMPLIMIENTO DEL PLAN DE TRABAJO

Se logró cumplir con el 90% de las actividades previstas para todo el proyecto.

3- OBJETIVOS ALCANZADOS.

- Se realizó una identificación en toda el área de estudio de lugares con fuentes de agua para su posterior análisis.
- Se logró capturar 70% de los ejemplares estimados para el desarrollo del proyecto.
- Se logró identificar el 100% de los roedores capturados por Familia y especie.
- Se obtuvieron 77 muestras de riñones para cultivo en medio Fletcher y para aplicar técnicas de diagnóstico por Biología Molecular.
- Se identificaron animales positivos por medio de técnica de cultivo.
- Se logró poner a punto la técnica de PCR para especies de roedores (rata, ratón y cobayo).
- Se logró poner a punto la técnica de PCR para leptospira.
- Se presentaron resultados de avances en Reuniones Científicas y se presentó trabajo para su publicación.

4-HIPÓTESIS CONFIRMADAS O REFUTADAS

Hallamos hasta el momento en la zona de estudio un alto predominio de la especie *Rattus rattus* que difiere significativamente con resultados publicados y hallados en otras regiones del país. Así mismo, se encontraron animales positivos por técnicas de cultivo y visualización microscópica, sin embargo resta corroborar resultados por medio de técnicas de biología molecular además de aumentar el número de muestras.

5) MÉTODOS Y TÉCNICAS EMPLEADAS:

Área de estudio:

El área de estudio localizada en la Provincia de Corrientes, a orillas del Río Paraná, en la Costanera Norte, se encuentra delimitada por el Barrio Molina Punta y Barrio Quinta Ferré en sus extremos y por el Río Paraná y la Avenida Armenia a ambos lados.

Captura de roedores:

Para la captura de los roedores se emplea jaulas trampas tipo Sherman (0,30m. x 0,14m. x 0,14m) utilizando como cebo grasa bovina o semillas de zapallo. Las mismas serán distribuidas en las diferentes viviendas del área en estudio. Periódicamente se efectuaran controles de captura por parte de los habitantes de las viviendas, quienes informan de la presencia de roedores capturados. Posteriormente las jaulas serán desinfectados antes de la reposición de nuevos cebos.

Traslado e identificación de animales capturados:

Los roedores capturados son trasladados en sus jaulas al laboratorio de la Cátedra de Salud Publica de la Facultad de Ciencias Veterinarias donde se los identifica en ficha individuales asentando datos tales como: edad, peso, sexo y especie. La identificación se lleva a cabo por medio de Clave de Osgood, 1943.

Diagnóstico de leptospirosis:

Para el diagnóstico de leptospirosis, se efectúa la necropsia de los roedores capturados bajo estricto manejo del buen trato animal, empleando como anestésico Hidrato de Cloral al 20%. Una vez realizada la apertura de la cavidad abdominal se extrae ambos riñones para su procesado mediante las siguientes técnicas:

-Diagnostico por técnica de Cultivo: para esta técnica se extrae asépticamente uno de los riñones, el que es macerado y sembrado en medio líquido de Fletcher. El material obtenido se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos para luego ser centrifugado a 1500rpm y nuevamente reposar 30 minutos. Seguidamente se extrae del sobrenadante 1ml que se siembra en medio semisólido de Fletcher e incuba a 28°C durante 48 horas. Transcurrido dicho tiempo se lleva a medio ambiente al abrigo de la luz.

La lectura se efectúa en microscopio de campo oscuro con objetivo 20X, a partir de los 15 días de la siembra.

Para corroborar que la leptospiras halladas en las muestras sembradas pertenece al grupo de las patógenas, aquellos cultivos que resulten positivos serán inoculados en hamsters de 21 días recién destetados. A los mismos, se los observará diariamente para comprobar signos de enfermedad o muerte. Los días 1, 3 y 5 a la inoculación, se obtendrá por punción cardíaca una pequeña cantidad de sangre el que será cultivado en medio semisólido de Fletcher. Estos animales si sobreviven a los 21 días pos-inoculación, se les realizarán la autopsia con el objeto de extraer asépticamente un riñón y ser procesado según el procedimiento descrito para el cultivo de riñón que se menciona mas adelante.

Para diagnóstico por técnica de PCR: el riñón restante se extrae también asépticamente, y una vez libre de capsula o cualquier otro tejido es fileteado en pequeños fragmentos para ser colocado en tubo Eppendorf y conservado a -20°C hasta su procesado en el laboratorio del servicio de biología Molecular de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

Cuando se procede a la extracción de ADN, las muestras de tejido previamente descongeladas son seccionadas con hoja de bisturí sobre placa de Petri estéril, hasta la obtención de piezas más pequeñas. El material logrado, y su remanente recuperado mediante lavados con agua destilada estéril, serán trasvasados a tubos Eppendorf nuevo. A estas muestras se les añade 500ul de agua destilada y se los lleva a centrifuga a 12000rpm por 4 minutos. Eliminado el sobrenadante, se incorpora CTAB (bromuro de cetil trimetil

amonio) y se deja en baño de maria durante 2 horas. Seguidamente se procede a lavar con soluciones de HCl-Isoamilico, Isopropilico y Etanol, todos ellos alternados con procesos de centrifugado. Terminado el lavado, se elimina el sobrenadante dando como producto final pelets de ADN puro. Estos son resuspendidos en 30ul de agua destilada.

El revelado de las reacciones de PCR se realiza por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% con buffer TBE (Tris- Acido bórico- EDTA) 1X y teñido con bromuro de etidio. La visualización se realiza por transiluminación con luz UV.

En cuanto a las muestras de agua, se toman diferentes fuentes de agua existentes (aguas servidas, canales de desagües) en la zona de estudio. En aquellos casos en que la profundidad es marcada, se extrae muestras a 10, 15 y 20 cm de profundidad.

Las muestras serán vertidas en frascos tapa rosca estériles y transportadas al laboratorio de la Cátedra de Salud Pública de la Facultad de Ciencias Veterinarias, donde serán procesado.

6) BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.

ALONSO ANDICOBERRY, C.; GARCÍA PEÑA, F.J.; ORTEGA MORA, L.M. Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina (Revisión). Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim. Vol 16 (2), 2001

BROWN, P; LEVETT, P. 1997. Differentiation of *Leptospira* species and serovars by PCR-restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR. J. Med. Microbiol. 46: 173-181

DEEK, J., H. LOPELMANN, R. KOKLES. Results of a serological survey infections among field hares (*Lepus europaeus*) in the German Democratic Republic. Internationalen Symposiums über die Erkrankung der Zoo- Wildtiere, 23- 27 Mai, pp 199- 204; 1990.

ELLIS, W.; O'BRIEN, J.; NEIL S.; FERGUSON, H.; HANNA, J. Bovine leptospirosis: microbiological and serological findings in aborted fetuses. Vet Rec. 110:147-150; 1982.

FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C. & PEROLAT, P. *Leptospira* and Leptospirosis, 2nd edn. Melbourne: MedSci. 1999.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Guia de vigilância epidemiológico. Ministério do Brasil: Brasília; 2003.

MAGALHAES VITAL-BRAZIL,J.; TERUSZKIN BALASSIANO, I.; SUTTER DE OLIVEIRA, F.; DÍAS DE SOUZA COSTA, A.; HILLEN,L.; PEREIRA ,M. 2010. "Multiplex PCR-based detection of *Leptospira* in environmental water samples obtained from a slum settlement". Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, 105 (3):353-355.

TRIFUNOVIC, Z., D. NESIC, S. ROMANIC, D. PALIC.. A study of leptospirosis in hares (*Lepus europaeus*) in two regions of Serbia, Acta Vet. Beograd. 41: 41- 46; 1991.

7- RESULTADOS OBTENIDOS (TRABAJOS PUBLICADOS, EN PRENSA, MANUSCRITOS EN REALIZACIÓN, PRESENTACIONES A CONGRESOS, ETC.)

Trabajos Publicados

✓ "Búsqueda de condiciones para detección y diferenciación molecular de *Leptospiras* sp. utilizando diferentes técnicas de extracción de ADN". Autores: Alegre, E. A.; De Biasio, M. B.; Ramirez, N. N.; Ruiz, R. M.; Bastiani, C. E. Revista Veterinaria Facultad de Ciencias Veterinarias ISSN- 1668-4834. En prensa.

✓ **Identificación y caracterización de refugios de quirópteros de la Ciudad de Corrientes, Argentina.** Bastiani, C.E.; Ramírez, N.N.; Alegre, E. A.; Ruiz, R. M. Revista Veterinaria Facultad de Ciencias Veterinarias ISSN- 1668-4834. En prensa.

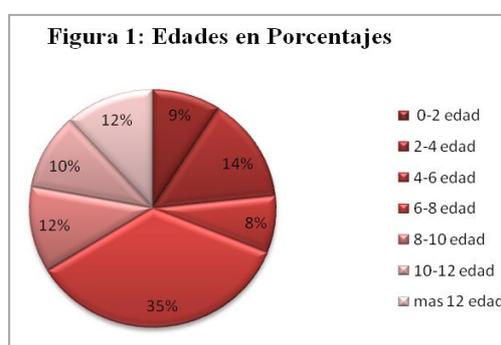
Presentaciones a Comunicaciones Científicas

✓ Presentación de Poster en “**XVIII Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste 2012**” organizada por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNNE, en el tema: “**Búsqueda de las Condiciones de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para leptospiras sp.** (CV-064.pdf). Autores: Alegre, Elsa A.; Ruiz, Raquel M.; Ramírez, Natalia N.; Bastiani, Cristian E.; De Biasio, María B. Realizado en el Campus Universitario “Deodoro Roca” los días 27 y 29 de junio de 2012 en la ciudad de Corrientes.

✓ Presentación de Poster en “**XVIII Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste 2012**” organizada por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNNE, en el tema: “**Búsqueda de las condiciones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para control de especies, murciélagos-roedores**”. Autores: Ramírez, Natalia N.; Bastiani, Cristian E.; Alegre, Elsa A.; Ruiz, Raquel M.; De Biasio, María B. Realizado en el Campus Universitario “Deodoro Roca” los días 27 y 29 de junio de 2012 en la ciudad de Corrientes.

Desarrollo de resultados alcanzados:

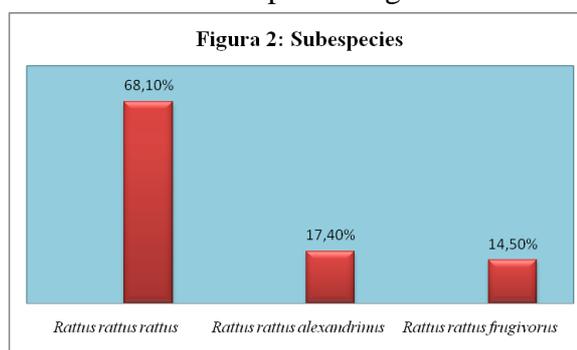
Para la identificación y registro de los individuos capturados se midieron longitud de cola y cuerpo, forma y tamaño de miembros posteriores y orejas; peso y color, también se asentaron grado de desarrollo de órganos sexuales a fin de obtener una edad más aproximada de los ejemplares. Se pudo apreciar que el rango de edad de los mismos oscilaron entre 2 a 12 meses observándose un mayor porcentaje entre los 6-8 meses de edad (**Figura 1**).



Se pudo apreciar que hay una mayor prevalencia de machos (53,2%) capturados sobre hembras (46,8%).

En cuanto a las especies capturadas cabe mencionar que solo un ejemplar perteneció a la especie *Mus musculus* siendo el resto identificados dentro de la especie *Rattus rattus*, contrariamente con lo que ocurre en la Provincia de Buenos Aires donde prevalece el *Rattus norvegicus*. Se observaron diferencias morfológicas en cuanto a color del manto, atribuibles posiblemente a características de las subespecies registrándose los siguientes datos:

La subespecie *Rattus rattus rattus* de color gris oscuro en lomo y vientre abarcó un 68,1% de los ejemplares capturados, un 17,4% perteneció a *Rattus rattus*



alexandrinus de color café en lomo y vientre gris oscuro y en un 14,5% en *Rattus rattus frugivorus* de lomo café y vientre blanco (**Figura 2**).

A los roedores capturados se les efectuó la necropsia con estricto manejo del buen trato animal, mediante la inoculación de Hidrato de Cloral al 20% como efecto anestésico a fin de exponer la cavidad abdominal y extraer ambos riñones.

Se obtuvieron 77 riñones que fueron destinados para diagnóstico de leptospirosis por técnica de cultivo en medio fletcher. A la lectura en microscopio hasta el momento presentaron positivos a leptospira 2 animales, estos últimos fueron repicados en medio fletcher para corroborar la presencia de espiroquetas.

El resto de las muestras no implican su negatividad debido a que el período de tiempo en el cual los cultivos pueden convertirse en positivos es de un período de hasta 6 meses, por lo tanto las lecturas deben continuarse haciendo y elevando el número de roedores capturados para cumplir con el objetivo principal.

De igual manera se obtuvieron mismo número de muestras para aplicar técnicas de biología molecular.

PUESTA A PUNTO DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA ESPECIES DE RATA, RATÓN Y HÁMSTER.

En la puesta a punto de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) para identificación de especie de Rata, ratón y hámster se emplearon muestras de médula ósea y bazo de un ejemplar capturado con el fin de ensayar la técnica y lograr las condiciones de amplificación de la misma antes de procesar los riñones.

Para la extracción de ADN se empleó el detergente CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio).

Se evaluó la eficiencia del método de extracción por electroforesis en agarosa 2% en buffer TBE 1X, observándose bandas de buena intensidad al transiluminar con luz UV.

-Técnica de PCR

Se establecieron las condiciones de amplificación para analizar una porción no codificante y conservada del genoma de rata, ratón y hámster (Walker et al. 2004). Para ello se utilizó un par de oligonucleótidos cebadores (primers) que luego de la amplificación en un volumen de 25µl dio un fragmento de aproximadamente 118pb. Se ensayaron reacciones según lo propuesto por el autor, conteniendo las siguientes concentraciones finales de reactivos:

| | |
|----------------------------|-----------------|
| 1X de Buffer de PCR | Promega |
| 1,5mM MgCl ₂ | Biodynamics |
| 200mM de cada dNTP | Promega |
| 200nM de cada primer | |
| 1,0U de Taq DNA polimerasa | Go-Taq, Promega |

El programa de ciclado tuvo el siguiente proceso: Desnaturalización inicial a 95°C durante 1 minutos, 30 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridización a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30segundos) y una Extensión final a 72°C por 4 minutos e incubación a 4°C.

Como molde se emplearon muestra de ADN de bazo y médula ósea de rata, obtenida por digestión con CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio), técnica descripta anteriormente, y un control negativo consistente en agua destilada.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa 1% en buffer TBE1x, teñidos con bromuro de etidio y visualizados por transiluminación UV.

PUESTA A PUNTO DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LEPTOSPIRAS SP.

-Preparación de Muestras: para la extracción de ADN, se procedió a descongelar y templar a 60°C muestras de tejido de los animales capturados y procesados en el laboratorio de Cátedra de salud Pública. Seguidamente se procedió a seccionar con hoja de bisturí sobre placa de Petri estéril logrando fragmentos más pequeños. El material obtenido fue trasvasó a un tubo Eppendorf nuevo y el material remanente recuperó mediante lavados con agua destilada estéril.

-Extracción de ADN

Para la técnica de extracción de ADN se ensayaron las Técnicas de Extracción con detergente CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio) y Técnica de hervido (Boiling).

La técnica de extracción de ADN con detergente CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio) se desarrollo sin modificaciones como fuera descripta anteriormente.

La técnica de extracción de ADN por Hervido consistió en el calentamiento de una solución constituida por 250µl de cada cepa de referencia y 1000 µl agua destilada estéril (boiling). A modo de evaluar el tiempo en que el ADN obtenido era amplificable, se procedió a un segundo calentamiento para lo cual se descongeló una alícuota del material del boiling original y se repitió el procedimiento de hervido antes descripto. Ensayamos un tercer calentamiento (re-re-boiling), lo cual requirió como material de partida, parte del producto del re-boiling operando de igual manera que en los casos anteriores y se evaluó el tiempo en que el ADN obtenido en todas sus variantes se mantiene amplificable, apreciándose que tanto la técnica original como sus variables se mantuvieron viables en el tiempo.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en buffer TBE 1X, teñidos con Bromuro de Etidio y visualizados por transiluminación UV.

-Técnica de PCR

Para la técnica de PCR, y dado que el Servicio Veterinario de Biología Molecular no contaba con la puesta a punto de técnica PCR multiplex para diferenciar especies de leptospiaras patógenas de saprófitas, se procedió inicialmente a establecer las condiciones de la misma. Para ello se analizaron una porción del gen que codifica una lipoproteína de membrana externa llamada LipL 32 (exclusiva de L. patógenas) y una porción del gen que codifica para ARN ribosomal 16S (presente en ambas) descripta por Magallanes Vital, Brazil et al; 2010. Se emplearon dos pares de primers cuyo producto final de amplificación en un volumen de 25µl dieron fragmentos de 474 y 430 pb cuando se trataba de L. patógenas y sólo uno de 430pb cuando se trató de L. saprófitas.

Así mismo, se ensayaron reacciones según lo propuesto por el autor (con modificaciones) conteniendo las siguientes concentraciones finales de reactivos:

1x de Buffer de PCR (Promega)
1,5mM de MgCl₂, 20mM de cada dNTPs (Promega)
1,0mM de cada primers
1,0U de Taq DNA polimerasa (Go-Taq, Promega).

El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C un minuto, hibridación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto) y una extensión final a 72°C por 7 minutos e incubación final a 4°C.

Como producto de amplificación a partir de muestras de ADN obtenidas por ambos métodos (CTAB y hervido), se logró obtener bandas de buena intensidad observándose dos bandas de tamaños diferentes para *Leptospiras* patógenas y solo una de ellas en leptospiras saprofitas.

Para esta técnica, se utilizaron como controles positivos de amplificación muestras de ADN extraídas a partir de cultivos bacterianos de *Leptospira Icteroahemorrhagiae*, *Canícola* y *apatógena* provistas por el Instituto de Patobiología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) INTA Castelar (Buenos Aires)

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa teñidos con Bromuro de Etidio y visualizados por transiluminación UV.

Como hallazgo de necropsia de los animales, se detectó una alta carga parasitaria de hymenolepis (24,6% de los roedores capturados), resultados que fueron presentados en reuniones científicas.

8- OBSTÁCULOS Y DIFICULTADES EN EL DESARROLLO DEL PLAN.

No se presentaron hasta el momento obstáculos que pudieran impedir el desarrollo del proyecto

9- REDEFINICIÓN DEL PLAN DE TRABAJO (CUANDO CORRESPONDA).

10- SUGERENCIAS QUE PUDIERAN RESULTAR DE INTERÉS PARA MEJORAR LAS CONDICIONES DE LOGRO DE LOS OBJETIVOS.

11- ACTIVIDADES DE DOCENCIA REALIZADAS.

a) Auxiliar Docente de 1° Categoría contratada en la *Cátedra de Bromatología e Higiene Alimentaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNNE* aprobado según Resolución N° 386/2012 en vigencia.

b) Docente Orientador en Taller de Prácticas Profesionales 2012 en el tema *Escherichia Coli Productor de Toxina Shiga (STEC)* de la *Cátedra de Bromatología e Higiene Alimentaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNNE* aprobado según Resolución N° 555/2012.