

DETECCIÓN DE LEPTOSPIRAS PATÓGENAS EN BOVINOS MEDIANTE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR LA FORMACIÓN DE LOOPS (LAMP)

Investigadores USAL:

Director Samartino, Luis (luis.samartino@usal.edu.ar); Brihuega, Bibiana; Mercado, Elsa

Resumen

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa de distribución mundial causada por una espiroqueta del género *Leptospira* spp., endémica en nuestro país y de difícil diagnóstico por su presentación polimórfica. La técnica *gold standart* para diagnosticar leptospirosis es el test de microaglutinación (MAT).

El objetivo de esta investigación fue probar si hay correlación entre el diagnóstico serológico por MAT y la presencia de ADN en suero usando la técnica LAMP para diagnosticar leptospirosis en animales domésticos.

Fueron utilizados 80 sueros caninos de la provincia de Buenos Aires para testear anticuerpos antileptospirosis con Aglutinación microscópica (MAT), usando 10 cepas de *Leptospira* spp. (*Leptospira interrogans* serovar Canicola, serovar Hardjo, serovar Hebdomadis, serovar Icterohaemorrhagiae, serovar Pomona, serovar Pyrogenes, serovar Wolffi, *Leptospira borgpeterseni* serovar Castellonis, serovar Tarassovi, y *Leptospira kirshneri* serovar Grippothyphosa).

Se extrajo ADN leptospiral de las muestras usando resina Chelex 100 para ser usado como templado para PCR (reacción en cadena de la polimerasa) específico de leptospira y loop-mediated isothermal amplification (LAMP).

Se usó un PCR para amplificar secuencias características del ADN utilizando primers específicos (técnica Gravekamp et al. modificada) y para la reacción de LAMP se utilizó la técnica descrita por Koizumi et al., 2012. El producto obtenido fue incubado usando una coloración denominada verde de malaquita.

Se obtuvieron óptimos resultados. De los 80 sueros caninos analizados, 48 fueron positivos a MAT. Doce de ellos positivos por PCR y LAMP. Aquellos sueros positivos a MAT y negativos a PCR y LAMP, presentaron títulos muy bajos a MAT (1/200). Los sueros negativos a MAT, lo fueron también a PCR y LAMP.

PCR y LAMP mostraron la misma sensibilidad detectando el ADN leptospiral. Estos resultados demuestran que es posible usar LAMP para la detección de leptospirosis en caninos y que la MAT tiene una mayor sensibilidad que la PCR y LAMP actualmente disponibles. Tras estas pruebas satisfactorias, se sigue investigando en bovino.

Palabras clave: leptospirosis; sueros; LAMP; diagnósticos

Abstract

Leptospirosis is an infectious disease of global distribution caused by a spirochete of the genus

Leptospira spp. Endemic in our country, and of difficult diagnosis by its polymorphic presentation. The gold standard technique for diagnosing leptospirosis is the microagglutination test (MAT).

The objective of this investigation was to test if there is a correlation between the serological diagnosis by MAT and the presence of DNA in serum using the LAMP technique to diagnose leptospira in domestic animals.

Eighty canine sera from the province of Buenos Aires were used to test anti-leptospira antibodies with microscopic agglutination (MAT) using 10 strains of *Leptospira* spp. (*Leptospira interrogans*, serovar Canicola, serovar Hardjo, serovar Icterohaemorrhagiae, serovar Pomona, serovar Pyrogenes, serovar Wolffi, *Leptospira borgpetersenii*, serovar Castelloni, serovar Tarassovi, *Leptospira kirshneri* serovar Grippothyphosa).

Leptospiral DNA was extracted from the samples using Chelex 100 resin, to be used as annealed for leptospira-specific PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP).

A PCR was used to amplify the features of DNA sequences using specific primers (modified Gravekamp et al technique) and for the reaction of LAMP we used the technique described by Koizumi et al., 2012. The product obtained was incubated by using a colour called malachite green.

Optimal results were obtained. Of the 80 canine sera analyzed, 48 were positive for MAT. Twelve of them were positive for PCR and LAMP. Those MAT positive and PCR and LAMP negative sera samples had very low titers to MAT (1/200). MAT negative sera samples were also negative for PCR and LAMP.

PCR and LAMP showed the same sensitivity in detecting the leptospiral DNA. These results demonstrate that it is possible to use LAMP for the detection of leptospirosis in canines and that MAT has a higher sensitivity than the PCR and LAMP currently available. Following these satisfactory tests, bovines remain under investigation.

Keywords: Leptospirosis; serum; LAMP; diagnostics