

PROGRAMA DE VINCULACIÓN DE CIENTÍFICOS Y TECNÓLOGOS – Convocatoria 2018

Facultad de Ciencias Veterinarias- UNA
Sandra Pérez Macchi s.perez.macchi@gmail.com

RESUMEN

En el estudio se determinó la detección, prevalencia y caracterización molecular de *Bartonella* spp. en felinos domésticos del Departamento Central. La detección a través de qPCR del gen *nuoG* para *Bartonella* spp. se realizaron en 125 muestras de sangre de gatos de la zona Central. Las muestras positivas para qPCR *nuoG* fueron sometidas a PCR convencional para la detección de los genes; *groEL*, *ITS*, *rpoB*, *fstz*, *RIBc*, *pap-31* y posteriormente a la secuenciación para la diferenciación de especies y análisis filogenético. La prevalencia de ADN de *Bartonella* spp. en gatos fue del 20,8% (26/125). Se detectaron las especies identificadas como *B. henselae* y *B. clarridgeiae*. Estos resultados una vez publicados, serán el primer reporte de *Bartonella clarridgeiae* y *B. henselae*.

OBJETIVOS

General:

Realizar la detección y caracterización molecular de *Bartonella* spp. en gatos domésticos del Departamento Central, Paraguay.

Específico:

Estimar la prevalencia de la infección por *Bartonella* spp. en gatos domésticos del Departamento Central, secuenciar los productos de PCR obtenidos de los gatos positivos y realizar un análisis filogenético.

APORTES DE LA ESTANCIA

- Conocimiento práctico y teórico de la técnica PCR a tiempo real.
- Analisis de resultados.
- Conocimiento sobre diversidad genética utilizada actualmente en investigaciones para la detección tanto por qPCR y cPCR.
- Caracterización molecular.
- Cumplir el objetivo principal; confirmar que *Bartonella* spp. infecta a gatos domésticos del Departamento Central en el país.

ACTIVIDADES REALIZADAS

- Extracción y cuantificación de DNA a partir de 125 muestras de sangre entera de felinos domésticos: Las muestras de sangre de EDTA congeladas se descongelaron a temperatura ambiente y se agitaron en el Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria de la UACH, Valdivia, Chile. La extracción de ADN y la purificación de 200 µL de sangre se realizaron utilizando E.Z.N.A. Kit de ADN de tejido (Omega®, Georgia, EE. UU.), Según las instrucciones del fabricante.
- Se determinaron la concentración de ADN y la pureza (espectrofotómetro NanoDrop ND-1000; Thermo Scientific®, EE. UU.).

El ADN se almacenó a -20 ° C antes de realizar los ensayos de PCR.

- Detección molecular por cPCR de gen endógeno: El gen 28S rDNA se usó como control interno para un ensayo de PCR para el ADN genómico felino utilizando primers específicos para descartar la presencia de inhibidores de la PCR.

- Detección molecular por qPCR para *Bartonella* spp.: Las muestras positivas de 28S rDNA cPCR se enviaron posteriormente a una qPCR para *Bartonella* spp. dirigidos al gen *nuoG*. Las reacciones de amplificación se realizaron por duplicado en placas de PCR de bajo perfil Multiplate TM (BioRad®, Hercules, CA, EE. UU.) en termociclador térmico CFX96 (BioRad®, Hercules, CA, EE. UU.). Se usó el ADN de *Bartonella henselae* obtenido de un gato infectado naturalmente como control positivo. Todas las pruebas de PCR se realizaron con agua libre de nucleasas (Thermo Scientific®, EE. UU.) como control negativo. Las repeticiones que mostraron una diferencia de Cq superior a 0,5 se volvieron a probar.

- Detección molecular por cPCR de genes de *Bartonella* spp para una mayor caracterización molecular y diferenciación de especies: las muestras positivas con el gen *nuoG* de *Bartonella* spp en el qPCR, descrita anteriormente, se analizaron usando cPCR, dirigido a fragmentos de 767 pb del gen *groEL*, 515 pb del gen *fstz*, 717 pb del gen *ITS*, 588 pb del gen *ribC*, 333 pb del gen *rpoB* y 564 pb del gen *pap-31*. Las reacciones de amplificación de cPCR se realizaron utilizando un termociclador BioRad T100 (BioRad®, Hercules, CA, EE. UU.).

- Electroforesis: Los productos de PCR convencionales se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (LE Agarose Seakem®, Lonza) teñidos con SYBR® Tinción de gel de ADN segura (Thermo Scientific®, EE. UU.).

- Purificación de muestras positivas: Todas las muestras que dieron positivas en el cPCR para cada gen diferente de *Bartonella* spp. se purificaron por reacción enzimática (ExoSAP-IT™) (Thermo Scientific®, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante y se enviaron a MacroGen® (Corea) para su secuenciación mediante el método de Sanger.

RESULTADOS OBTENIDOS

La prevalencia de ADN de *Bartonella* spp. en gatos fue del 20,8% (26/125). Se detectaron las especies identificadas como *B. henselae* y *B. clarridgeiae*. Estos resultados una vez publicados, serán el primer reporte de *Bartonella clarridgeiae* y *B. henselae*, demostrando que se encuentran circulando en felinos domésticos de Paraguay.

La circulación de éstas dos especies refuerza la importancia de la población felina como fuente de agentes zoonóticos y representa

un riesgo potencial de infección para los humanos. Aunque la mayoría de los gatos son asintomáticos después de infectarse con *B. henselae*, sirven como reservorios del agente y pueden transmitir la infección a los humanos.

La importancia y aplicabilidad de los resultados obtenidos, al demostrar la presencia de *B. henselae* y *B. clarridgeiae* en gatos; sugiere la necesidad de considerar a estos agentes cuando se analizan muestras clínicas de casos humanos sospechosos en Paraguay y alentar a que se lleven a cabo más estudios en diferentes áreas del país.

CONCLUSIÓN

Puedo concluir que la actividad llevada a cabo a través del programa de vinculación fue muy exitosa y altamente provechosa en todo punto de vista. Todos los objetivos propuestos en el proyecto lo cumplimos; los cuales fueron realizar la detección y caracterización molecular de *Bartonella* spp. en gatos domésticos del Departamento Central, Paraguay, estimar la prevalencia de la infección por *Bartonella* spp. en gatos domésticos del Departamento Central.

El secuenciamiento de los productos de PCR obtenidos de los gatos positivos y el análisis filogenético también lo cumplimos. Cabe recalcar, que a parte de todo lo propuesto adicionamos sobre los hallazgos hematológicos y la diversidad genética entre los 6 genes diferentes de tal manera a generar más impacto, poder publicar y hacer conocer nuestros resultados en una revista internacional con alto factor de impacto.

VISIÓN Y PLANES FUTUROS

Con el conocimiento adquirido de la técnica, podremos aplicarlo a todo tipo de investigaciones y proyectos que vayamos adquiriendo en la Institución, esto nos ayudaría a seguir investigando, al implementar esta línea de investigación, así también, para estandarizar diversos protocolos que puedan ser utilizados para servicio veterinario en conjunto con el Hospital Veterinario - UNA.

*Actualmente en conjunto con la Dra. Ananda Muller, nos encontramos redactando el paper, para su posterior publicación.