



DESARROLLO DE PCR_{BIO} CON DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA PARA EL *MYCOBACTERIUM BOVIS* Nisola, Milagros

Laboratorio de Sensores y Biosensores, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL.

Directora: Hernández, Silvia

Codirectora: Fabiano, Silvia

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Tuberculosis bovina, *Mycobacterium bovis*, PCR_{bio}-ELISA electroquímico.

INTRODUCCIÓN

La Tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad infecto-contagiosa de distribución mundial producida por la bacteria *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) que afecta principalmente las cuencas lecheras, ocasionando no solo pérdidas directas en la producción de lácteos y carnes, sino también implicaciones legales por las restricciones para el comercio. Además, al ser una enfermedad zoonótica por su propagación también tiene implicancias en la Salud Pública (Cataldi A. A., 2014).

En Argentina, las mayores tasas de prevalencia de TBB se presentan en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba. Las pérdidas anuales directas e indirectas debidas a la TBB ascienden a US\$ 63 millones, produciendo pérdidas estimadas del 13% en la producción lechera. La disminución del volumen de leche por los animales infectados y la calidad de los subproductos se ve afectada debido a la disminución de la cantidad de grasa obtenida, y aumentan también los animales decomisados (Torres P., 2013).

Los métodos de diagnóstico de TBB, pueden ser *post-mortem* y *ante-mortem*, este último se puede dividir en los *directos* e *indirectos*. Los *directos* se basan en detectar los bacilos por cultivo y/o baciloscopia o por métodos moleculares como la PCR. Si bien el cultivo es considerado la prueba de referencia diagnóstica, es extremadamente lenta y posee limitaciones en cuanto a su sensibilidad. Se ha podido aumentar la sensibilidad y especificidad analítica mediante la aplicación de la PCR CONVENCIONAL. Por otro lado, los métodos *indirectos* infieren la presencia del *M. bovis* por medio de respuestas inmune serológica y/o celular *in vitro* o *in vivo*, estos son discutidos ya que dependiendo del estadio de la enfermedad resultan inespecíficos.

El Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina del SENASA establece que

Título del proyecto: Determinación electroquímica en flujo de productos de PCR relacionados al <i>Mycobacterium bovis</i> (<i>M. bovis</i>)
Instrumento: CAID Orientado
Año convocatoria: 2018
Organismo financiador: CAID 206 / CAID Orientado 2016 / ASaCTel 2016
Directora: Hernández, Silvia Raquel

el diagnóstico de la situación de las unidades productivas (UP) debe realizarse con una prueba tuberculínica, e iniciar así las actividades de saneamiento con la implementación de por lo menos dos pruebas tuberculínicas anuales. Para lograr la certificación oficial de establecimiento libre de TBB, deben lograr dos resultados negativos consecutivos a dichas pruebas.

Del análisis de las ventajas y desventajas de las distintas pruebas diagnósticas, se desprende la necesidad de desarrollar y disponer de herramientas diagnósticas confiables que agilicen y simplifiquen los controles de los rodeos bovinos.

OBJETIVOS

- Desarrollar un método diagnóstico denominado *PCR_{BIO}-ELISA Electroquímico* basado en la amplificación selectiva de la secuencia de inserción *IS6110* (248 pb) presente en el *M. bovis* (incluido en el Complejo *M. tuberculosis*) por *PCR_{BIO}* a partir de muestras de leche, y la determinación de los amplicones por un ELISA con detección electroquímica.

METODOLOGÍA

Realización del ELISA con detección electroquímica:

Se toman 8 μL de la solución de amplicones diluida (1/100) y se deposita sobre los electrodos impresos (SPE) comerciales (DS-DRP 110 STR). Por la Biotina (BIO) en uno de sus extremos, los amplicones quedan anclados sobre los SPE modificados con estreptavidina; y por la Digoxigenina (DIG) en el otro extremo son reconocidos por un anticuerpo anti-digoxigenina (0.05 U mL^{-1}) marcado con la enzima Peroxidasa (HRP), que, por la adición de los sustratos (2.50 mM OPD y 1.25 mM H_2O_2) se desencadena la reacción enzimática. Sus productos a los 20 min generan una respuesta eléctrica, proporcional a los amplicones en la muestra y, por lo tanto, relacionado a la presencia al *M. bovis*. Insumiendo un tiempo total de análisis de 3 h.

Evaluación electroquímica y selección de la señal analítica:

Para determinar la cupla redox de interés, se ensayaron a los sustratos OPD y H_2O_2 en presencia y ausencia de la HRP a 10^{-8} mol L^{-1} , mediante voltametría cíclica (VC). En la Figura 1 se pueden observar voltamogramas cíclicos típicos, donde el potencial formal vs. el potencial del electrodo de pseudo referencia Ag/AgCl es mV. También, se puede observar que los sustratos manifiestan respuestas pocos significativas en ausencia de la enzima peroxidasa. Por otro lado, se aplicó a la voltametría de onda cuadrada (VOC) como técnica electroanalítica para la recolección de la señal analítica, la Figura 2 muestra voltamogramas típicos de VOC, tomándose como señal analítica el primer pico de intensidad de corriente correspondiente a un potencial cercano a los -170 mV.

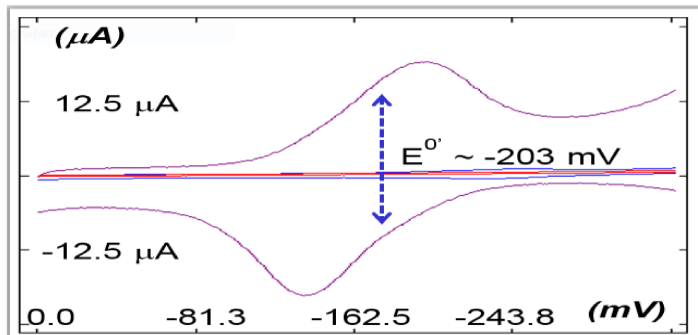


Figura 1. VC (50 mV s^{-1}) Rojo: PBS; Azul: Sustratos en ausencia de HRP; Violeta: Sustratos en presencia de HRP

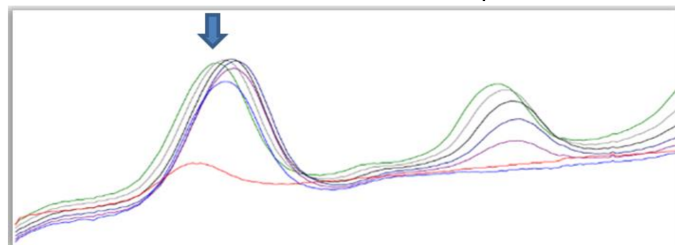


Figura 2. VOC(0 a -200 mV) Rojo: Sustratos en ausencia de HRP; otros colores: Sustratos en presencia de HRP.

Optimización de las condiciones experimentales del ELISA-Electroquímico:

Se emplearon soluciones controles y muestras tipificadas para la definición de las condiciones experimentales. En la Tabla 1 se pueden ver los pasos y los reactivos involucrados en el procedimiento.

Tabla 1		
Paso	Operación / Reactivos	Tiempo
1	Bloqueo de SPE con BSA 1-2 % (m/v) en PBS pH = 7.2	30 min
2	Dilución de amplicones (1/100) en BSA 1-2 % (m/v) en PBS pH = 7.2	10 min
3	8 μ L solución de amplicones a 37°C	40 min
4	Lavar x 2 con Tween 20 (0.05%) PBS pH = 7.2 a 37°C	20 min
5	8 mL solución de anti Digoxigenina – HRP (0.05 U mL ⁻¹) a 37°C	40 min
6	Lavar x 2 con Tween 20 (0.05%) PBS pH = 7.2 a 37°C	20 min
7	40 μ L solución de sustratos orto fenil endiamina (OPD) (2.5 mM) y H ₂ O ₂ (1.25 mM) en PBS pH = 6.0	20 min
8	Señal analítica = Intensidad de Corriente de Reducción (μ A) por VOC, rango de potencial (0 a – 200 mV)	< 15 s

Aplicando este protocolo se logró determinar cantidades de ADN por ensayo en el rango de 0.4 a 1.6 fg en contraste con 80 fg mínima cantidad alcanzada por la PCR CONVENCIONAL. Esto representaría una sensibilidad 50 veces superior.

Determinación de amplicones del M. bovis a partir de leches de tambo mediante el ELISA-Electroquímico

La Figura 3 muestra las respuestas instrumentales tanto de una muestra de leche de tanque a la cual se aplicó el procedentito PCR_{BIO}-ELISA-Electroquímico como de tres diluciones de un control positivo, dejando evidenciado la aplicación de la metodología.

Para definir el tiempo de lectura, se analizaron las respuestas en el tiempo, de tres concentraciones de un Control Positivo. La mayor resolución (o separación de las respuestas) entre las diferentes concentraciones, se observó a partir de los 20 minutos. En la Figura 4 se puede observar el resultado del análisis de cuatro muestras de leches incógnitas procesadas por la PCR_{BIO} y de los correspondientes Controles negativo y positivo. Para clasificar a las muestras se utilizó el porcentaje de positividad, tres muestras resultaron positivas y una negativa, presentando una correlación significativa tanto con una prueba PCR_{BIO} ELISA Óptico desarrollada precedentemente por nuestro grupo (Cislaghi A.P, 2017) y con la prueba oficial de la tuberculina.

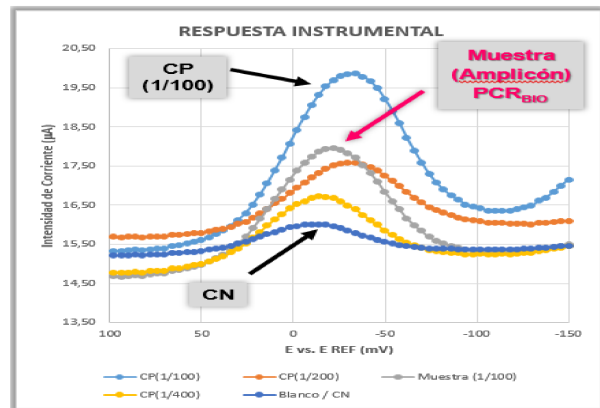


Figura 3. Voltamograma de onda cuadrada

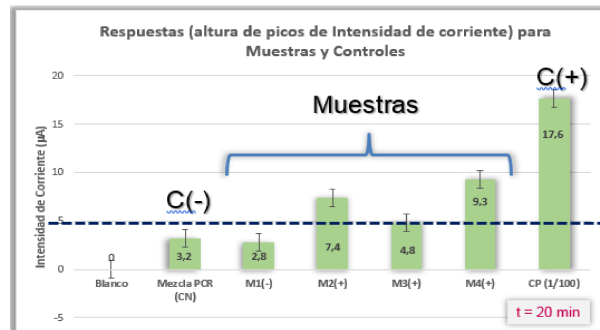


Figura 4. Análisis de muestras por PCR_{BIO}-ELISA Electroquímico

Expresión de resultados:

Para la expresión de los resultados del método analítico fue conveniente expresar los resultados como Porcentajes de Positividad (PP) (1), tomando como 100% el control interno positivo (ADN proveniente de un cultivo de *M. bovis*).

$$PP [\%] = \frac{I_R(\text{Muestra}) - I_R(\text{CIN})}{I_R(\text{CIP}) - I_R(\text{CIN})} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

- ✓ *PP (%)*: es el porcentaje de positividad.
- ✓ *CIP (Control Interno Positivo)*: valor medio de la Intensidad de corriente de reducción ($E = E_{\text{aplicado}}$ vs. E_{ref}) utilizando un control con productos de PCR cuyo ADN molde amplificado corresponde a ADN de *M. bovis* de cultivo.
- ✓ *CIN (Control Interno Negativo)*: valor medio de la Intensidad de corriente de reducción ($E = E_{\text{aplicado}}$ vs. E_{ref}) utilizando un control con productos de PCR sin adicionar ningún ADN molde.

Para determinar la sensibilidad analítica, se realizaron diluciones seriadas preparadas a partir de una muestra control de ADN de *M. bovis* de concentración conocida, determinando la máxima dilución capaz de desarrollar una I_R superior al obtenido con el control negativo.

CONCLUSIONES

El método PCR_{BIO}-ELISA-ELETROQUIMICO desarrollado fue capaz de determinar una cantidad de ADN 50 veces inferior a la alcanzada por medio de la PCR_{CONVENCIONAL}.

Las cuatro muestras de leche analizadas se pudieron diferenciar y correlacionar con una prueba PCR_{BIO}-ELISA-Óptico y con los resultados de la prueba de la tuberculina (prueba oficial aprobada por SENASA) efectuada en los animales.

Para dar continuidad al trabajo, deberemos procesar mayor cantidad de muestras (más de 30 tanto positivas como negativas) para definir un límite de corte (cut off) de la metodología.

No obstante, este método es un avance tecnológico, si bien se debe continuar con la automatización de todas sus etapas y con la miniaturización de sus componentes. Estos avances resultarían útiles para el monitoreo de tambos, y para la generación de estrategias en la Salud Pública con la finalidad de la erradicación de esta zoonosis.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Cislaghi, A.P., (2017). Desarrollo y aplicación de una técnica ELISA-PCR para la detección de *Mycobacterium bovis* en muestras bovinas. (Tesina) Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. UNL. Santa Fe. Argentina.

Cataldi A.A., (2014), 28 de agosto. Nueva técnica para controlar la tuberculosis bovina. Recuperado de <https://inta.gob.ar/noticias/nueva-tecnica-para-controlar-la-tuberculosis-bovina>

Torres, P. (2013). Diagnóstico y Control de Enfermedades Producidas por Micobacterias: Tuberculosis y Paratuberculosis. CEBASEV. Septiembre.