

# PUESTA A PUNTO DE UNA PCR DIGITAL (*DROPLET DIGITAL PCR*) PARA DIAGNÓSTICO Y CUANTIFICACIÓN DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PRODUCTOR DE MASTITIS EN URUGUAY

Diana.L<sup>1</sup>, De Torres. E<sup>2</sup>, Puentes. R<sup>1</sup>

(1)Departamento de Patobiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. (2)Campo experimental N°2, Facultad de Veterinaria Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

## INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina producida por *Staphylococcus aureus* genera grandes pérdidas económicas para el productor lechero. Las técnicas moleculares como la PCR nos han permitido realizar el diagnóstico de una gran variedad de patógenos en distintos tipos de muestras incluyendo la leche. En este contexto la *Droplet Digital PCR* (ddPCR) es la última generación de PCR que permite poder amplificar y cuantificar patógenos partiendo de muestras muy complejas o poco concentradas ya que tiene una gran sensibilidad y precisión comparando con las técnicas existentes (PCR convencional y PCR en tiempo real).

## OBJETIVO/S

Poner a punto una *Droplet Digital PCR* (ddPCR) para la detección y cuantificación *Staphylococcus aureus* a partir de cultivos y de muestras de leche inoculadas artificialmente.

## MATERIALES & MÉTODOS

Partiendo de cultivos puros de la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 6538 se realizó la extracción de ADN genómico que se diluyó de forma seriada en base 10 (-1 a la -6) para su posterior amplificación y cuantificación por ddPCR usando la química de Evagreen. Posteriormente utilizando una suspensión de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL de la cepa ATCC de *S. aureus* se realizaron diluciones en base diez utilizando como diluyente leche UHT adquirida comercialmente. Se realizó la extracción de ADN genómico para cuantificar la cantidad de ADN bacteriano en cada dilución mediante ddPCR.

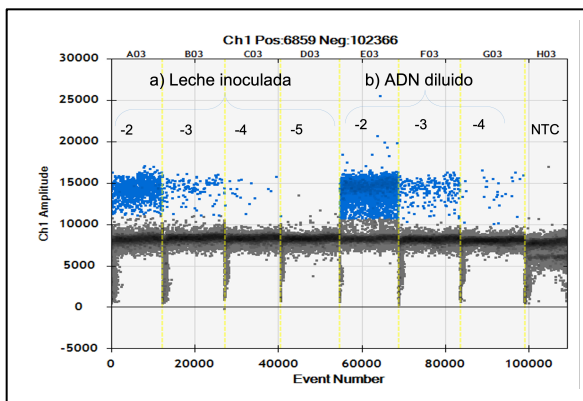
## RESULTADOS

Figura 1: Tabla de resultados de la cuantificación en copias/ $\mu$ L de las diluciones de ADN de *Staphylococcus aureus* obtenidas a partir de cultivo

Sample	T	Target	Cono(copias/ $\mu$ L)
Sa ATCC 6538	U	Stock	3600
Sa ATCC 6538	U	-1	1768
Sa ATCC 6538	U	-2	673
Sa ATCC 6538	U	-3	35.9
Sa ATCC 6538	U	-4	3.3
Sa ATCC 6538	U	-5	0.2
Sa ATCC 6538	U	-6	0
Sa ATCC 6538	U	Agua	0

La amplificación y cuantificación del ADN genómico a partir de los cultivos puros de todas las cepas fue óptimo obteniendo una cuantificación, en copias/ $\mu$ L, decreciente en relación a las diluciones de la -1 a la -6 (Figura 1). La cuantificación del ADN que se obtuvo en copias/ $\mu$ L a partir de las diluciones en leche inoculada se correlacionó con las diluciones realizadas (Figura 2).

Figura 2: Gráfico de gotas de la ddPCR. a) cuantificación de as diluciones partir de la leche inoculada ,b) cuantificación de las diluciones del ADN extraído de cultivo.



## CONCLUSIONES

Podemos concluir que la ddPCR es una herramienta útil y confiable para poder realizar el diagnóstico de la mastitis clínica y subclínica inclusive cuando la carga bacteriana es baja. Futuros ensayos se realizarán para comparar los resultados obtenidos con la real time PCR y estandarizar la técnica para los demás patógenos de importancia en mastitis.