

MASTIPADS (MASTITIS PATHOGENS DETECTION SYSTEM): DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DETECCIÓN SIMULTANEA DE MÚLTIPLES PATÓGENOS ASOCIADOS A MASTITIS BOVINA MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA DIRIGIDA.

González-Revello, Alvaro^{1,2,3}; Figueroa, Yamila²; Pereira, Jaquín¹; Licandro, Santiago¹; Umpiérrez, Ana²; Calvo, Mauricio⁴; Piccini, Claudia²; Smircich, Pablo¹; Zunino, Pablo^{2*}; Sotelo-Silveira, José^{1*}

*Ambos autores contribuyeron de forma equivalente al trabajo

¹Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Departamento de Genómica. Montevideo. Uruguay. ²Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Departamento de Microbiología. Montevideo. Uruguay. ³Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Montevideo. Uruguay. ⁴Cooperativa Laboratorio Veterinario de Colonia (COLAVECO). Nueva Helvecia. Colonia. Uruguay.

La mastitis bovina es una de las enfermedades más comunes y costosas para la industria láctea y la causa más importante asociada a problemas de calidad de la leche. Es causada por microorganismos, típicamente bacterias que establecen una infección intramamaria provocando una reacción inflamatoria. La primera línea para el control de las enfermedades infecciosas es el desarrollo y aplicación de métodos de diagnóstico que sean rápidos, sensibles y precisos. Estos métodos constituyen una herramienta de utilidad para el manejo de la mastitis en los rodeos, así como orientan al momento de instaurar un tratamiento antimicrobiano. Actualmente, el cultivo bacteriano es el método de referencia para la identificación de microorganismos causantes de mastitis. Entre las limitaciones del cultivo, un problema frecuente, es la baja tasa de recuperación bacteriana (25 a 45% de las muestras no producen crecimiento bacteriano). Las muestras analizadas sin crecimiento son costosas y frustrantes para el laboratorio, el veterinario y el productor lechero. En contraposición, la detección simultánea de segmentos de ADN únicos y característicos de distintos organismos mediante secuenciación de nueva generación (NGS, *Next Generation Sequencing*) han brindado la oportunidad de desarrollar un método integral para la identificación de agentes infecciosos. El objetivo del presente trabajo fue diseñar un panel de cebadores *AmpliSeq™* capaz de amplificar genes marcadores de los principales agentes patógenos de mastitis bovina para su implementación en el diagnóstico molecular por NGS. Esta tecnología permite la amplificación simultánea de cientos/miles de productos de PCR (multiplex de alto rendimiento) previo a la secuenciación masiva y paralela. Para cumplir con el objetivo se diseñó un panel que consta de 251 juegos de cebadores que cubren 65 genes con información diagnóstica y filogenética de 35 patógenos bacterianos, fúngicos y virales. El panel es compatible en dos reacciones de PCR-multiplex (126 y 125 juegos respectivamente) asociados al sistema de secuenciación Ion Torrent (IonS5). Como aproximación inicial, el panel se desafió con controles de ADN de cepas de colección (comunidad simulada con 4 especies bacterianas) y con 10 muestras clínicas de leche remitidas a un laboratorio veterinario comercial. Se confirmó que los cebadores detectaban los patógenos previstos en la comunidad simulada (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*). El panel desarrollado también tuvo éxito en la detección de patógenos en las muestras clínicas, concordando con los resultados previos de cultivo. Adicionalmente, en algunas muestras clínicas se detectó más de un patógeno u otras especies no previstos por los análisis de rutina. Estos resultados sugieren que la NGS dirigida a marcadores genéticos se puede utilizar para pruebas de detección de patógenos de mastitis más completas que las actuales.

Financiación: ANII_FSSA_1_2019_1_160114