

Puesta a punto de una PCR digital (*Droplet Digital PCR*) para diagnóstico y cuantificación de *Staphylococcus aureus* productor de mastitis en Uruguay

**LETICIA DIANA¹, ELENA MARÍA DE TORRES TAJES² Y
RODRIGO PUENTES¹**

¹ Departamento de Patobiología, Facultad de Veterinaria Universidad de la República (UDELAR). Montevideo, Uruguay

² Campo Experimental N° 2, Facultad de Veterinaria Universidad de la República (UDELAR). Montevideo, Uruguay

letdiana22@gmail.com

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). El objetivo de este trabajo fue poner a punto una Droplet Digital PCR (ddPCR) para la detección y cuantificación de *Staphylococcus aureus* a partir de cultivos y de muestras de leche inoculados artificialmente. 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. Posteriormente, utilizando una suspensión de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de la cepa ATCC de *S. aureus* se realizaron diluciones en base 10 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. La amplificación y cuantificación del ADN genómico a partir de los cultivos puros fue óptima obteniendo una cuantificación, en copias/ μ l, descendiente en relación a las diluciones de la -1 a la -6. Se pudo observar que la ddPCR es capaz de cuantificar de forma clara y precisa ADN bacteriano a partir de cultivo, incluso a concentraciones muy bajas de ADN ($\leq 0,3$ ng/ μ l). Finalmente la cuantificación del ADN que se obtuvo en copias/ μ l de las diluciones realizadas en leche fue coherente con las diluciones realizadas. La ddPCR es una herramienta útil y confiable para poder realizar el diagnóstico de la mastitis clínica y subclínica incluso 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.

Palabras clave: producción, enfermedad, biología molecular.