

***Neisseria gonorrhoeae*: optimización del diagnóstico por PCR; estudio de la infectividad, la persistencia y la respuesta inmune**

***Neisseria gonorrhoeae*: optimization of the diagnosis by PCR; study of infectivity, persistence and immune response**

N. Guzmán; C. Salafia; S. Dinamarca; G. Recalde y C. Quintero. Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Juan A. Maza. Mendoza. Argentina

Contacto: cquintero@umaza.edu.ar

Palabras clave: *Neisseria gonorrhoeae*; PCR; Invasión Celular

Key Words: *Neisseria gonorrhoeae*; PCR; Cell Invasion

Introducción: *Neisseria gonorrhoeae* es un patógeno Gram negativo, de transmisión sexual que primariamente infecta el tracto urogenital, causante de la enfermedad conocida como gonorrea. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó en el año 2008 la cantidad de casos de infecciones, siendo de 106.100.000 casos en el mundo, con 36.400.000 casos nuevos cada año. La misma OMS publicó en febrero de 2017 su primera lista de «patógenos prioritarios» resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana. En dicha lista, *N. gonorrhoeae* es calificada como Prioridad 2: ELEVADA. En la actualidad, hay en Mendoza un desconocimiento de las cifras oficiales de incidencia de *N. gonorrhoeae* en la población. Actualmente en Mendoza no se utilizan técnicas de biología molecular para el diagnóstico del gono-coco, se utilizan técnicas clásicas de cultivo. La técnica de PCR no sustituye al cultivo, pero lo complementa y posibilita una detección más rápida y más sensible.

Objetivo: se propone realizar una optimización del diagnóstico de *Neisseria gonorrhoeae* mediante el uso de técnicas de PCR y el estudio de la maquinaria molecular involucrada en la infectividad, replicación y/o persistencia intracelular de *Neisseria gonorrhoeae*.

Metodología: se realizarán cultivos bacterianos de *N. gonorrhoeae*, provenientes de cepas comerciales y/o modificadas, en medio *Tayer-Martin* modificado, en incubador termostatzado con presencia de 5% de CO₂ a 37°C. La bacteria en cultivo tiene una sobrevivencia de 60 hs. Pasado ese tiempo, la bacteria muere. Las mismas se utilizarán para los experimentos de infección bacteriana y como control positivo de PCR. Se realizará PCR tradicional con muestras provenientes de pacientes de hospitales del Gran Mendoza. Se compararán los resultados con los datos obtenidos de estas muestras en Buenos Aires, donde actualmente se realizan los diagnósticos. Como control positivo se utilizará la cepa aislada. La muestra será tomada en su totalidad en los hospitales.

La detección se realizará en geles de agarosa con tinción de Syber Safe. Para los ensayos de invasión las células HeLa serán incubadas *N. gonorrhoeae* en sus-pensión. El contacto célula huésped-patógeno será por gravedad, sin centrifugación. Para permitir el ingreso de la bacteria, los distintos tiempos de incubación serán de 12 a 48 hs dependiendo de la naturaleza del experimento a realizar.

Resultados: estamos poniendo a punto la infección o invasión de células de mamífero por parte de *N. gonorrhoeae*. El mismo requiere de la optimización del medio de suspensión de la bacteria, sobre-expresión de los receptores de la familia CEACAM (para facilitar la endocitosis de la bacteria), los tiempos de incubación y la detección de la bacteria intracelular. Esto permitirá luego realizar ensayos para el estudio de la maquinaria molecular en la infectividad, replicación y persistencia intracelular. Estamos trabajando en el tratamiento previo de la muestra, las condiciones de PCR y la detección en geles de agarosa. Esto nos permitirá ser capaces de detectar *N. gonorrhoeae* por PCR en muestras reales. Y será el punto de partida para ofrecer el servicio de detección por parte del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad Juan Agustín Maza.