



XLI SESIÓN DE COMUNICACIONES CIENTÍFICAS
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
2021

ISSN 2451-6732



**Optimización de condiciones experimentales para la identificación de *L. chagasi*
analizando diferentes secuencias del genoma**

De Biasio M.*; Esquivel G.; Vega L.; Jastrzebski F.; Almirón E.

Servicio Veterinario de Biología Molecular. Sargento Cabral 2139, (3400) Corrientes - Facultad de Ciencias Veterinarias (U.N.N.E).

* Email: maribadb@yahoo.com.ar

Resumen:

La leishmaniasis visceral es una zoonosis grave causada por *Leishmania donovani* y *Leishmania infantum/chagasi*, para la cual los perros infectados son el principal reservorio. Con el objetivo de disponer de métodos específicos para la identificación del genoma de *Leishmania chagasi* en muestras de caninos se optimizaron las condiciones químicas y térmicas para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la cual se amplificaron dos fragmentos diferentes de *Leishmania chagasi*. Las reacciones fueron PCR sencillas llevadas a cabo con un volumen final de 25ul y contuvieron 1X de Buffer de PCR, 0,2 μ M de cada oligonucleótido cebador (RV1/RV2 o LCS1/LCS3); 0,2mM de una mezcla equimolecular de dNTPs, 1U de Taq ADN polimerasa y 1,5 o 2,0mM MgCl₂, según se utilicen los pares de primers RV1/RV2 dirigidos a una secuencia de ADN altamente repetitiva del ADN kinetoplastídico o LCS1/LCS3 dirigidos a genes de ARNr18S. En todos los casos se incorporaron controles positivos cedidos gentilmente por el Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chaben" y controles negativos consistentes en agua destilada. Las condiciones térmicas para la amplificación mediada por primers RV1/RV2 fueron: desnaturación inicial: 94°C por 5min, luego 35 ciclos de desnaturación a 94°C por 60seg; pegado de primer: 59°C por 60seg; extensión: 72°C por 60seg; extensión final: 72°C por 5min; incubación: 4°C hasta su utilización. Las condiciones térmicas para la amplificación mediada por primers LCS1/LCS3 fueron: desnaturación inicial: 94°C por 2min, luego 40 ciclos de desnaturación a 94°C por 30seg; pegado de primer: 55°C por 30seg; extensión: 72°C por 60seg; extensión final: 72°C por 2min; incubación: 4°C hasta su utilización. Los productos de amplificación de ambas reacciones fueron fragmentos de 145pb y 259pb respectivamente. Éstos fueron separados y visualizados por electroforesis en gel de agarosa 2%, teñidos con bromuro de etidio y observados por transiluminación UV. Dada la elevada sensibilidad y especificidad de los métodos moleculares, cuando fueron aplicados a muestras de control positivos ambas dieron bandas de amplificación detectables del tamaño esperado, no observándose bandas en muestras de ADN control correspondientes a *Leishmania brasiliensis*.

Palabras clave:

PCR, zoonosis, visceral.