



XLI SESIÓN DE COMUNICACIONES CIENTÍFICAS
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
2021

ISSN 2451-6732



Puntos críticos y errores en la puesta a punto de PCR para diagnóstico de ehrlichiosis canina

Mansilla-Fernández S.L.^{1,2*}; Cainzos R.P.¹; Delgado M.B.¹; Koscinczuk P.¹; Merino L.²

1. Cátedra de Patología médica. Facultad de Ciencias Veterinarias (UNNE).

2. Instituto de medicina Regional (UNNE).

* Email: sl_mansilla@hotmail.com

Resumen:

El objetivo de este trabajo es informar los puntos críticos en la puesta a punto de PCR para diagnóstico de *Ehrlichia sp.* Diversos estudios han demostrado que la especificidad, rendimiento y fidelidad de la PCR son influenciados por los componentes que la integran: 1-calidad del ADN extraído, 2-mezcla de reacción, 3-régimen de ciclaje y 4-ADN polimerasa. 1) La extracción de ADN se realiza con columnas comerciales Roche y actualmente se adaptó el kit Inbio K1501 al protocolo del K1205. Siendo necesario corregir las concentraciones del buffer de lavado para asegurar una extracción apropiada. 2) Para cada reacción se utilizó 8,5 µL de Master Mix y 1,5 µL de ADN de la muestra. La Master Mix se compone de 5,62 µL de agua, 1 µL de Buffer 10x, 1,2 µL de MgCl 25 mM, 0,2 µL dNTPs 10 mM, 0,4 µL Primers F+R, 0,08 µL HotFirepol y 1,5 µL de ADN. 3) Se trabajó con 35 ciclos, para cuidar la integridad de la enzima. 4) Se utilizó Hot FirePol de Solis Biotec determinándose un rango de temperaturas de ciclado en 95-95-60-72-70 °C de los cuales corresponden a 15 minutos de desnaturalización, 5 minutos por ciclado y 8 minutos de extensión final. Un mayor rango de temperatura afecta la especificidad de la enzima. Un parámetro crítico adicional fue la concentración de sales sódicas y potásicas de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) fijando la concentración de anticoagulante en 70 µL de EDTA (0,342 mol/L) por mililitro de sangre, este reactivo es un fuerte inhibidor de reacción, de ahí la importancia de su control. En conclusión, el conocimiento de cada etapa, reactivo y variantes dentro de la PCR es fundamental a la hora de validar el diagnóstico molecular. Se debe considerar que al ajustar algunas condiciones de la reacción para lograr mayor especificidad no siempre es compatible con un alto rendimiento, y tratar de optimizar la fidelidad puede afectarse la eficiencia. La puesta a punto es una etapa operatoria que requiere supervisión constante para que cada componente de la reacción se amalgame y se consiga el máximo rendimiento sin perder sensibilidad diagnóstica.

Palabras clave:

Ehrlichia sp., molecular, etapa