



XXVII Comunicaciones Científicas y Tecnológicas

Orden Poster: CA-049 (ID: 2461)

Autor: Mansilla Fernandez, Silvia Lorena

Título: Influencia de los reactivos en la puesta a punto de PCR convencional para diagnóstico de ehrlichiosis canina

Director: Merino, Luis Antonio

Co-Director: Koscinczuk, Patricia

Palabras clave: Ehrlichia canis, PCR, secuenciación de ADN, perros

Área de Beca: Cs. Agropecuarias

Tipo Beca: Conicet

Periodo: 01/04/2021 al 31/03/2023

Lugar de trabajo: Imr - Instituto De Medicina Regional

Proyecto: (17B002) Enfermedades transmitidas por vectores, gamapatías mono y policlonales, identificación del agente causal en medicina veterinaria.

Resumen:

La microbiología clínica es un campo en constante demanda de técnicas diagnósticas que dan respuesta a los programas de prevención, control y tratamiento de enfermedades emergentes y reemergentes. La ehrlichiosis canina es causada por una bacteria Gram negativa, intracelular obligada, del orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae, géneros Ehrlichia, especies E. canis, E. ewingii y E. chaffeensis. El diagnóstico oportuno de la enfermedad es un desafío debido a las diferentes fases con que cursa la patología (subclínica, aguda y crónica) y sus múltiples manifestaciones clínicas. Las opciones diagnósticas incluyen identificación de cuerpos de inclusión en frotis de sangre periférica, detección de anticuerpos con kit de inmunocromatografía ó ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y detección de ADN del patógeno mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las opciones son variadas, pero la PCR ofrece versatilidad, adaptabilidad y confianza en un corto tiempo, por lo que no reemplaza, sino que complementa el diagnóstico. Optimizar una técnica de PCR requiere trabajar a nivel de especificidad, sensibilidad y rapidez. El objetivo de este trabajo es informar los puntos críticos en la puesta a punto de PCR para diagnóstico de Ehrlichia sp. Las muestras fueron tomadas entre 1° de julio del 2019 y el 30 de junio del 2020 de caninos de las ciudades de Resistencia, Barranqueras, Corrientes y zonas aledañas. El procedimiento diagnóstico se inició con la anamnesis del canino sospechoso y se elaboró una historia clínica. Posteriormente, se extrajo 3 ml de sangre anticoagulada con EDTA y se realizó la extracción de ADN con un método comercial (High pure PCR template preparation kit, Roche). Se utilizaron primers dsb 330/728 y dsb 321/671 partiendo con la puesta a punto a partir de protocolos publicados. Estos reactivos se colocaron en un tubo, junto con los cofactores que necesitaba la enzima, y se sometieron a ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento para replicar la síntesis del ADN. 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 (los bloques básicos del ADN), 3-ADN polimerasa y 4-régimen de ciclaje. Se utilizó la ADN polimerasa Hot FirePol de Solis Biodyne, determinándose un rango de temperaturas de ciclaje en 95-95-60-72-70 °C de los cuales corresponden a 15 minutos de desnaturalización, 5 minutos por ciclaje 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. Se trabajó con 35 ciclos, para cuidar la integridad de la enzima. Los primers utilizados siguen siendo viables incluso hasta en 50 ciclos, pero en este caso en número menor de ciclos se fijó en cuanto a la utilidad de la enzima. El conocimiento de cada etapa, reactivo y variantes dentro de la PCR es fundamental a la hora de validar el diagnóstico molecular. Por lo tanto, 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 afectar 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.