

Utilización del gen de receptor de transferrina de *T.evansi* para su identificación en muestras de equinos

Busellato, M.V.^{1*}, Esquivel G. P., Montesi A. M., Maruñak S. L., De Biasio M.B.

¹Facultad de Ciencias Veterinarias-UNNE.

²Servicio Veterinario de Biología Molecular.

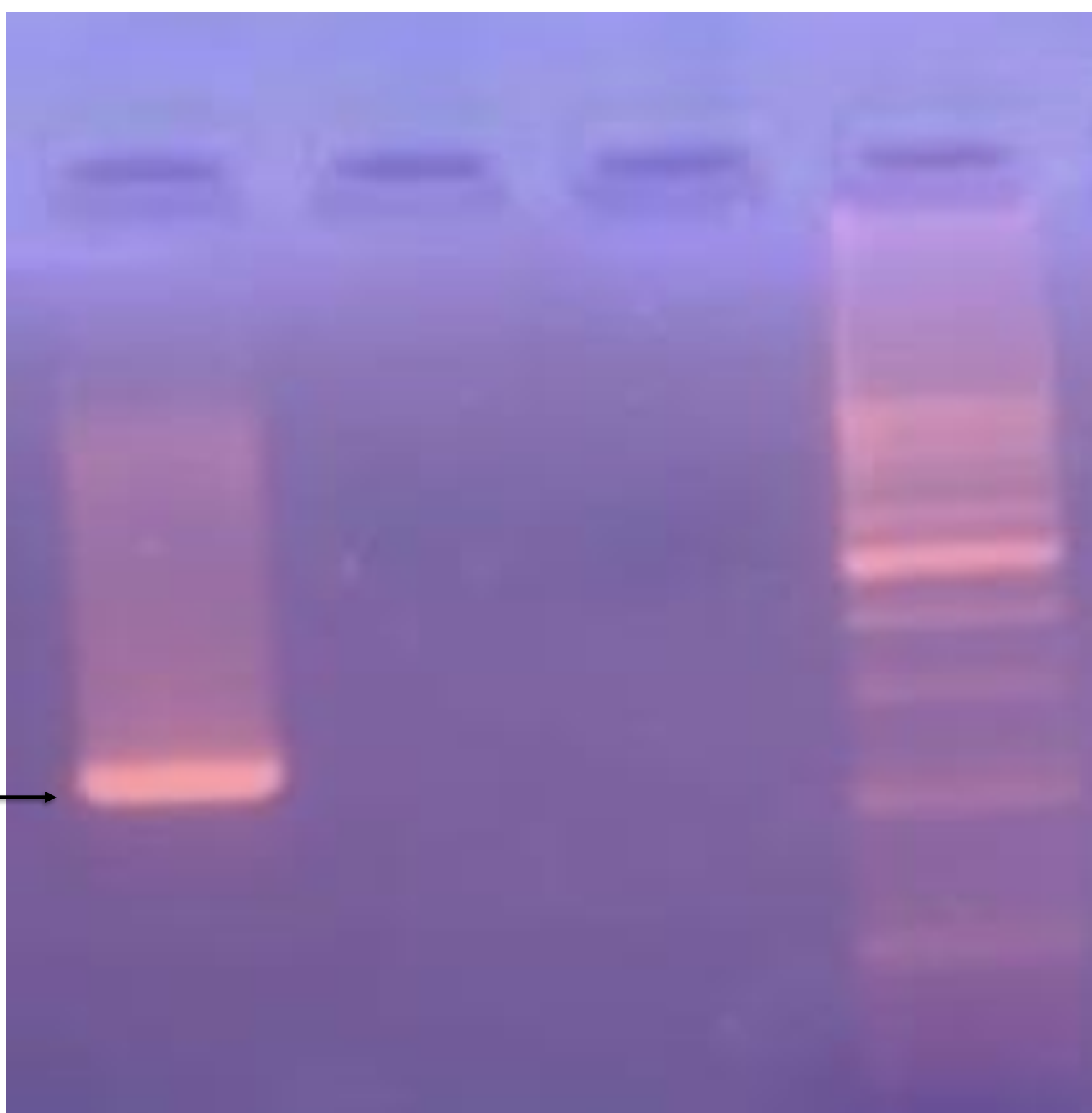
victoriabusellato@gmail.com

Introducción

La enfermedad causada por *Trypanosoma evansi*, un protozoo flagelado que ingresa al torrente sanguíneo de los equinos pudiendo producir síndrome anémico, fiebre, parálisis y muerte, puede ser diagnosticada mediante el método parasitológico directo de baja y variable sensibilidad, serología (ELISA) de baja especificidad o bien mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual es capaz de detectar hasta 1 parásito/ml de sangre. El objetivo del presente trabajo es hallar las condiciones óptimas para la amplificación de un fragmento del gen multicopia que codifica el complejo heterodimérico del receptor de transferrina en *T. evansi*.

Resultados

Los métodos moleculares aplicados a muestras de control positivo dieron como resultado bandas de amplificación detectables del tamaño esperado (237 pb) no observándose bandas en muestras de control negativo.



Electroforesis en agarosa 2% de PCR específica de fragmento del gen de transferrina de *T. evansi* (Amplicón específico 237 pb, flecha). Calle 1: Control positivo, calle 2: control negativo, calle 3: no sembrada y Calle 4: marcador de peso molecular (Cienmarker, Biodynamics).

Metodología

En el Servicio Veterinario de Biología Molecular se optimizaron las condiciones químicas y térmicas para la detección de un fragmento del gen del parásito. La reacción de PCR sencilla se llevó a cabo en un volumen final de 25µl que contuvo: 1X de Buffer de PCR, 0,5µM de cada oligonucleótido cebador (ESAG6/7 Fw y ESAG6/7 Rew); 0,2mM de una mezcla equimolecular de dNTPs, 1.5U de Taq ADN polimerasa y 1,5mM MgCl₂. En todos los casos se incorporó un control negativo consistente en agua destilada y un control positivo procedente de equinos infectados con el parásito y diagnosticados según el método parasitológico directo. Las condiciones térmicas para la amplificación fueron: desnaturalización inicial: 94 °C por 4 min, luego 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 60 s; pegado de primer: 55 °C por 60 s; extensión: 72 °C por 60 s y una extensión final: 72 °C por 5 min e incubación a 4 °C hasta su utilización. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 2 % en buffer TBE 1X, teñidos con bromuro de etidio y visualizados por transiluminación UV.

Conclusiones

La elevada sensibilidad de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos basadas en PCR, le confiere a esta técnica una gran utilidad en el diagnóstico de animales en fase crónica de la enfermedad o en estados en los que los métodos convencionales pierden sensibilidad. Además el hecho de utilizar los cebadores que están dirigidos a genes multicopia que codifican para el complejo heterodimérico del receptor de transferrina, aumentan la sensibilidad de nuestro ensayo.

El hallazgo de las condiciones óptimas de amplificación nos permitirá continuar realizando pruebas de sensibilidad y especificidad necesarias para mejorar el diagnóstico de la enfermedad parasitaria.

BIBLIOGRAFÍA

Mathieu P., Ketsarin K., Marc D., Nachai S., Sathaporn J. (2010). Una comparación de seis juegos de cebadores para la detección de *Trypanosoma evansi* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en roedores y ganado tailandés. Parasit. Vet. 171, 185-193.