



XVII SESIONES DE COMUNICACIONES

TÉCNICAS Y CIENTÍFICAS ESTUDIANTILES
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

2018

OPTIMIZACION DE PCR ANIDADA PARA LA DETECCION DE GENOMA DE *Leishmanias sp*

Vega Lucas, Kern Facundo, Almirón Enrique, De Biasio María
Servicio Veterinario de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE.
[e-mail: vegalucas633@gmail.com](mailto:vegalucas633@gmail.com)

La leishmaniasis visceral (LV) es una zoonosis grave, de evolución crónica causada por *Leishmania donovani* y *Leishmania infantum/chagasi*. Los perros infectados, con o sin manifestaciones clínicas, son el principal reservorio. El creciente abandono de los animales enfermos, junto a la adaptación al ámbito urbano y dispersión del vector, ha contribuido a que la incidencia y dispersión geográfica en nuestro país haya aumentado en los últimos años y se observe un cambio en la epidemiología de la enfermedad. Dada la gravedad de su evolución y la importancia de la identificación de los reservorios que favorecen el desarrollo del ciclo biológico del parásito se propone implementar técnicas moleculares sensibles y específicas para detectar fragmentos del genoma de *Leishmanias* en muestras de sangre y médula. En el Servicio Veterinario de Biología Molecular (SVBM) se optimizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de un fragmento del gen de la subunidad menor de ARNr específico del género *Leishmania*. Se realizó una PCR anidada consistente en 2 rondas de amplificación sucesivas de 25 µl de volumen final cada una; conteniendo: 1X de Buffer de PCR, 2,0mM MgCl₂; 0,2µM de cada oligonucleótido cebador (S4 y S12 para la primera ronda y S17 y S18 para la segunda); 0,2mM de una mezcla equimolecular de dNTPs y 2U de Taq ADN polimerasa. En todos los casos se utilizaron 2µl de ADN e igual volumen de agua para el control negativo de amplificación. Las muestras de ADN utilizadas fueron cedidas gentilmente por el Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatała Chabén" y procedieron de cultivos del género *Leishmania*. Las condiciones térmicas para la primera ronda fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 60'', pegado de primer a 50°C durante 60'', extensión a 72°C durante 60'' y extensión final a 72°C durante 7 min, finalizando con incubación a 4° hasta su utilización. El producto obtenido luego de la primera ronda se utilizó como ADN molde para la segunda ronda cuyas condiciones térmicas fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 4 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 60'', pegado de primer a 55°C durante 60'', extensión a 72°C durante 30'' y extensión final a 72°C durante 10 min, finalizando con incubación a 4° hasta su posterior utilización. Como producto de amplificación de la primera y segunda ronda se obtuvieron fragmentos de 520pb y 490pb respectivamente. Los mismos fueron separados y visualizados por electroforesis en gel de agarosa 1%, teñidos con bromuro de etidio y observados por transiluminación UV. Considerando la elevada sensibilidad y especificidad de los métodos moleculares, consideramos que son de gran importancia para su aplicación a muestras de sangre y médula ósea de caninos en los casos donde no se pueda llegar a un diagnóstico por métodos convencionales (examen microscópico directo y serología).

Poster

CICLO BASICO