



XXVII Comunicaciones Científicas y Tecnológicas

Orden Poster: CA-014 (ID: 2274)

Autor: Nottidge, Evelyn

Título: Optimización de condiciones químicas y térmicas para la detección del genoma del virus Herpes Simplex Equino 1 y 4

Director: Maruñak, Silvana Licia

Co-Director: De Biasio, Barbara

Palabras clave: PCR, abortos, Herpes

Área de Beca: Cs. Agropecuarias

Tipo Beca: Evc - Cin

Periodo: 01/08/2021 al 01/08/2022

Lugar de trabajo: Facultad De Cs. Veterinarias

Proyecto: (19B007) Detección molecular de agentes infecciosos causantes de abortos equinos

Resumen:

Las pérdidas gestacionales ocasionadas por infecciones virales, bacterianas y fúngicas, tienen una alta prevalencia en la industria hípica, traduciéndose en elevadas pérdidas económicas en los haras de nuestro país. Estos agentes producen brotes enzoóticos por lo que el diagnóstico precoz constituye uno de los pilares para el control de estas enfermedades y es por eso que la utilización de técnicas diagnósticas rápidas es fundamental para decidir las medidas profilácticas y terapéuticas a emplear. El objetivo del trabajo es optimizar las condiciones experimentales químicas y térmicas para la identificación del genoma de virus de Herpes Simplex Equino 1 y 4 utilizando una reacción de cadena de la polimerasa (PCR) seminested. Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo con un volumen final de 25 μ l y contuvieron: 1X de Buffer de PCR, 2,5mM MgCl₂, 2,0 μ M de cada oligonucleótido cebador (HVE-1Fw/ HVE-1Rew para la primer ronda de amplificación y HVE-1Fw/ HVE-1Rn para la segunda ronda de amplificación para virus de herpes simplex equino 1 y HVE-4Fw/ HVE-4Rew para la primer ronda de amplificación y HVE-4Fw/ HVE-4Rn para la segunda ronda de amplificación para virus de herpes simplex equino 4); 200 μ M de una mezcla equimolecular de dNTPs, 0,5U de Taq ADN polimerasa. En todos los casos se incorporaron controles positivos consistentes en ADN de HVE 1 y HVE 4 cedidos gentilmente por el Instituto de Virología Equina del INTA Castelar y controles negativos consistentes en agua destilada. Las condiciones térmicas para la amplificación fue idéntica para ambas rondas de amplificación y ambos tipos virales: desnaturización inicial: 95°C por 5min, luego 35 ciclos de desnaturización a 95°C por 30seg; pegado de primer: 60°C por 30seg; extensión: 72°C por 60seg; extensión final: 72°C por 1min; incubación: 4°C hasta su utilización. Los tamaños de los productos de amplificación de la primera y segunda ronda fueron fragmentos de 636pb y 287pb para HVE-1 y de 509 y 323pb para HVE4. 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 del método molecular empleado, cuando fueron aplicados a muestras de control positivos ambas dieron bandas de amplificación detectables del tamaño esperado, no observándose bandas indicativas de reacciones cruzadas.