

Técnica molecular para la detección de Herpesvirus en productos de aborto equino

Solari F.I., Montesi A.M., *Maruñak, S.L., Almirón E.C., Jaztrebsky F., De Biasio M.B.

Servicio Veterinario de Biología Molecular SVBM de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNNE. *smarunak@yahoo.com.ar

Resumen:

La tasa global de pérdidas gestacionales en la población de caballos en Argentina varía de 5 a 15%, dependiendo del período en que ocurra la pérdida gestacional hablamos de muerte embrionaria, aborto o mortinato. El aborto viral equino o rinoneumonitis equina, es una de las enfermedades de distribución mundial más graves que pueden padecer los equinos; la enfermedad es causada por los Herpesvirus equinos tipos 1 y 4 (HVE-1 y HVE-4). Ambos virus son potenciales factores de riesgo de enfermedad para caballos de todas las edades y categorías, especialmente para los potros. HVE se disemina rápidamente y requiere intervención inmediata. La identificación temprana del agente es necesaria para la rápida ejecución de medidas de control apropiadas, prevenir o detener un brote, e implementar un tratamiento del caballo infestado para reducir la posibilidad de complicaciones causadas por infecciones secundarias. El objetivo del trabajo es la detección de genoma de herpes virus equino 4 utilizando la reacción en cadena de la polimerasa seminested (PCRsn). Se procesaron 28 muestras correspondientes a 10 casos clínicos, 6 de las cuales fueron tejidos fetales (placenta, riñón, hígado y pulmón) y 4 muestras de hisopado de útero, utilizados para la extracción de ADN. Dos reacciones de amplificación sucesivas fueron llevadas a cabo en un volumen final de 25µl y conteniendo: 1X de Buffer de PCR, 2,5mM MgCl₂, 2,0µM de cada oligonucleótido cebador (HVE-4Fw/ HVE-4Rew para la primer ronda de amplificación y HVE-4Fw/ HVE-4Rn para la segunda ronda de amplificación); 200µM de una mezcla equimolecular de dNTPs, 0,5U de Taq ADN polimerasa. Se utilizó un control positivo de PCR consistentes en ADN de HVE-4 cedidos gentilmente por el Instituto de Virología Equina del INTA Castelar y un control negativo consistente en agua destilada. Las condiciones térmicas para la amplificación fueron: desnaturalización inicial: 95°C por 5min, luego 35 ciclos de desnaturalización 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 509 y 323pb, éstos fueron separados y visualizados por electroforesis en gel de agarosa 2%, teñidos con bromuro de etidio y observados por transiluminación UV. Como resultado obtuvimos 2 casos clínicos detectables para HVE-4, uno para las muestras de riñón e hígado y el otro solo en hígado, ambos casos mostraron bandas de amplificación específica luego de realizar la segunda ronda de amplificación. Este estudio demuestra la ventaja del uso de Nested PCR en cuanto a la sensibilidad, ya que se utiliza una porción más pequeña de la muestra para obtener una amplificación específica y eficiente.

Palabras clave: Detección, genoma, Herpesvirus