

Desarrollo de una técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para detección del ARN del Virus de la Diarrea Viral Bovina en muestras clínicas.

Velázquez R¹, Cabaña E¹, Silvetti J¹, Vergara M¹, Russi N, Favaro P¹.

¹. Cátedra de Microbiología, FCV, UNL. paulafavaro10@gmail.com

El Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB, familia *Flaviviridae*, género *Pestivirus*) es un agente infeccioso del ganado bovino que afecta los parámetros productivos y reproductivos de los rodeos a nivel mundial. Las pérdidas económicas causadas por la Diarrea Viral Bovina (DVB) son debidas a infertilidad, menor producción de leche, lento crecimiento fetal, diarrea, enfermedad respiratoria, abortos, teratogénesis, reabsorción embrionaria, momificación fetal, disfunciones inmunológicas, infecciones concurrentes y la producción de terneros persistentemente infectados (PI)¹. Los animales PI son los más importantes reservorios y dispersan grandes cantidades de virus durante toda su vida, transmitiéndolo a animales susceptibles⁴. Los programas de control más exitosos que se llevan a cabo en muchos países, principalmente europeos, están orientados a la detección y remoción de animales PI y la prevención de su reintroducción en los rodeos con medidas de bioseguridad que incluyen o no la vacunación².

La detección de los animales PI puede realizarse de diferentes formas: 1) evaluando la presencia de la partícula viral viable por aislamiento viral, técnica muy laboriosa, costosa y lenta; 2) detección de antígeno viral, por ejemplo, a través de un ELISA importado; 3) detección del material genético por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Desafortunadamente, existen pocos laboratorios de diagnóstico veterinario que cuenten con las capacidades operativas e infraestructura para diseñar y ofrecer planes de saneamiento de animales PI, a lo que se suma el acceso restringido y los altos costos de importación de kits comerciales para la detección del VDVB.

El objetivo del presente trabajo es desarrollar una técnica de PCR que permita detectar el genoma del VDVB y que pueda ofrecerse a futuro como servicio de diagnóstico destinado a productores y veterinarios de la región, así como al Hospital de Salud Animal (HSA) de la FCV. El servicio será llevado a cabo por el SAT (Servicio a Terceros) de Microbiología del HSA.

Para ello, se usó como control positivo una muestra de suero positiva a PCR cedida por el Instituto de Virología de INTA Castelar. Además, se procesaron dos muestras de suero cedidas por INTA Balcarce y tres muestras de casos sospechosos provenientes del HSA (779 bazo, 796 suero, 797 bazo). Como control negativo se usó agua libre de ARNasas y ADNasas.

Para la extracción de ARN, se utilizó el método TRIzol (TRIzol LS Reagent, Invitrogen) según recomendaciones del fabricante. El ARN extraído se almacenó a una temperatura de -80°C hasta su procesamiento. Para la reacción de retrotranscripción, por cada tubo de reacción, se utilizaron 5 µl de buffer de MMLV, 1 µl de mezcla de dNTP (Promega), 0.5 µl del cebador (326), 0.25 µl de enzima MMLV (Promega), 13.25 µl de agua libre de nucleasas y 5 µl del ARN extraído. En el termociclador (TECHNE TC-3000) se realizó un programa consistente en: 30 minutos a 42°C y 7 minutos a 95°C. Para la reacción de PCR se utilizaron los cebadores 324 y 326³ en una mezcla compuesta por 5 µl de buffer Taq, 0.5 µl de MgCl₂, 1 µl de cada cebador, 0.5 µl de mezcla de dNTP, 0.25 µl de enzima GoTaq Polimerasa (Promega), 11.75 µl de agua libre de nucleasas y 5 µl del ADN complementario obtenido en el paso anterior. En el termociclador, el programa consistió en un paso de desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por un minuto, alineamiento a 55°C por un minuto y extensión a 72°C por un minuto. Finalmente, un paso de extensión a 72°C por 7 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis, usando un gel de agarosa al 1,5% con tinción de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen), esperando detectar un producto de 288 pares de bases (pb) correspondiente a un fragmento del sector 5'UTR del genoma del VDVB. Dichos productos

VII JORNADA DE DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN

Noviembre 2019. Esperanza. Santa Fe. Argentina.

Área temática: **SALUD ANIMAL**

fueron visualizados en transiluminador (Safe Imager 2.0, Invitrogen). Para comparar el tamaño de los fragmentos amplificados se utilizó un marcador de peso molecular (CienMarker, Biodynamics) desde 100 a 1000 pb con incrementos de 100 pb.

En el control positivo, como en las muestras cedidas por INTA Balcarce se observaron bandas de amplificación cercanas a la banda de 300 pb del marcador de peso molecular, lo cual indica que se detectó y amplificó material genético específico del VDVB. En las muestras 779, 796, 797 y el control negativo, no se observaron bandas de amplificación, por lo tanto, las mencionadas muestras, no contenían genoma del VDVB.

Mediante la técnica utilizada se logró detectar una región del genoma del VDVB en muestras previamente declaradas positivas por PCR en otros laboratorios.

En adelante, se continuará probando distintas cepas del VDVB y distintas diluciones de virus para poner a punto la técnica de PCR, así como distintos tipos de muestras (suero, bazo, ganglios linfáticos), con el fin de realizar un servicio de diagnóstico que facilite las posibilidades diagnósticas en la zona.

Bibliografía

- 1- Khodakaram-Tafti, A.; Farjanikish, G.H. (2017). Persistent bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in cattle herds. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 18, 154-163
- 2- Moennig, V.; Becher, P. (2018). Control of Bovine Viral Diarrhea. *Pathogens*, 7, 29
- 3- Vilcek, S.; Herring, A.J.; Herring, J.A.; Nettleton, P.F.; Lowings, J.P.; Paton, D.J. (1994). Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol*. 136, 309-323
- 4- Wernike, K.; Gethmann, J.; Schirrmeier, H.; Schröder, R.; Conraths, F.J.; Beer, M. (2017). Six Years (2011–2016) of Mandatory Nationwide Bovine Viral Diarrhea Control in Germany - A Success Story. *Pathogens*, 6, 50