

XXI REUNIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

“DR. BERNARDO JORGE CARRILLO”

ASOCIACION ARGENTINA DE VETERINARIOS DE LABORATORIO DE DIAGNOSTICO

Fundada el 21 de noviembre de 1984

Personería Jurídica 439/96

Afiliada a la World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (WAVLD)



6, 7 y 8 de OCTUBRE de 2016
SAN SALVADOR DE JUJUY

XXI Reunión científico-técnica Dr. Bernardo Jorge Carrillo : Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico / Raúl Eduardo Marin ... [et al.] ; compilado por Raúl Eduardo Marin ... [et al.]. - 1a ed . - San Salvador de Jujuy : Universidad Nacional de Jujuy, 2016.

182 p. ; 29 x 21 cm.

ISBN 978-987-3926-15-0

1. Diagnóstico. 2. Veterinaria. 3. Bacteriología. I. Marin, Raúl Eduardo II. Marin, Raúl Eduardo, comp.

CDD 636.089

ISBN 978-987-3926-15-0



COMISION DIRECTIVA 2015-2016

Presidente:

- Dr. Raúl Eduardo Marín

Vicepresidente:

- Dra. Carmen Maffrand

Tesorera:

- Dra. Nirma González

Secretaria:

- Dra. Sandra Romero

Vocales Titulares:

- Dr. Daniel Aguirre
- Dra. María Graciela Draghi
- Dra. Carolina Gorchs
- Dra. Daniela Susana Martinis Mercado

Vocales Suplentes:

- Dra. Ana María Canal
- Dr. Gustavo Combessies
- Dra. Elvira María Falzoni
- Dr. Luis Samartino

V8- DESARROLLO DE UN ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA POR PCR EN TIEMPO REAL PARA DETECTAR INFECCIÓN POR VIRUS DE LEUCOSIS BOVINA.

L. Martínez Cuesta, M.V. Nieto Farias, P. Lendez, G. Dolcini y C. Ceriani.

Laboratorio de Virología, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN, CONICET-CICPBA), Facultad de Cs. Veterinarias, UNCPBA, Pasaje Arroyo Seco s/n, (7000) Tandil, Argentina. cceriani@vet.unicen.edu.ar

Introducción: El virus de la leucosis bovina (BLV) es un retrovirus ampliamente distribuido en los tambos de nuestro país (1). El virus infecta principalmente linfocitos B y la transmisión ocurre por contacto con células infectadas. La mayoría de los animales infectados permanecen asintomáticos, pero en algunos casos la enfermedad progresa a linfocitosis persistente o linfosarcoma (2). Los animales infectados pueden desarrollar alta o baja carga proviral. Los animales de alta carga proviral serían más eficaces en la transmisión del virus por la gran cantidad de linfocitos infectados circulantes en sangre que poseen. Las pérdidas económicas producto de la infección son muy importantes, de ahí la relevancia del problema y la necesidad de identificar a los animales con alta carga proviral para intentar disminuir la tasa de transmisión (3).

Objetivo: Desarrollar un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) utilizando SYBR Green para detectar la presencia del BLV en linfocitos de sangre periférica, amplificando una región altamente conservada del gen *pol*.

Materiales y métodos: Se realizó una cuantificación absoluta del gen *pol* en animales infectados con serología positiva y PCR convencional negativa para la infección con BLV. Para elaborar la curva de calibración se utilizaron como estándar diluciones seriadas del plásmido pBLV913 en agua. El plásmido pBLV913, que contiene una copia completa del virus (gentileza de la Dra G. Buehring, University of California, Berkeley), se usó para transformar bacterias TOPO10 y luego se purificó usando un kit comercial (Axygen, Biosciences). La concentración de ADN plasmídico se midió en el equipo NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Se construyó una curva estándar con diluciones del plásmido conteniendo de 10^5 a 10 copias del virus. Cada punto de la curva se amplificó por triplicado y la eficiencia de amplificación se determinó mediante un modelo de regresión lineal de acuerdo a la ecuación $E = 10[-1/\text{slope}]$ (4). La curva estándar se validó repitiendo al menos 3 veces la amplificación.

RESULTADOS:

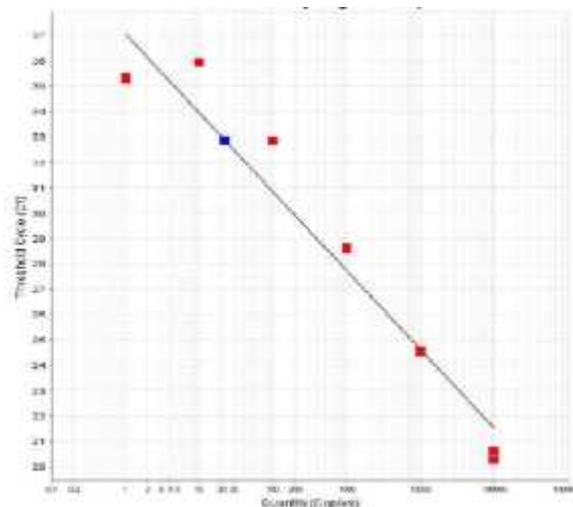


Figura 1: Curva estándar Ct (*Threshold cycle*) vs número de copias. $y = -3,104 x + 37,043$. $R^2: 0,945$.

Se analizaron veinte animales con serología positiva/PCR convencional negativa para BLV. El ensayo de cuantificación absoluta por qPCR permitió detectar un bajo número de copias del virus (>100 copias). El punto de corte se determinó de forma arbitraria. Se consideran de baja carga proviral aquellos animales que tengan menos de 100 copias del virus cada 30 ng de ADN de células mononucleares de sangre periférica.

Conclusiones: Los animales con serología positiva y PCR convencional negativa se consideran de baja carga proviral. Con este ensayo de alta especificidad y sensibilidad se pueden discriminar a los animales infectados en alta y baja carga proviral. La metodología desarrollada permite detectar hasta 10 copias del virus por reacción.

BIBLIOGRAFIA:

1. Giraud J. *et al.* Bovine Enzootic Leukosis, Sitio Argentino de Producción Animal 2010.
2. Gillet N. *et al.* Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* 2007 4:18.
3. Bartlett P.C., *et al.* Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 2014 244:914-922.
4. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Reserch* 2001; 29(9).