



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**DETECCIÓN DEL GEN DE LA GLICOPROTEINA B
DEL VIRUS HERPES CANINO A TRAVÉS DE
LA REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA**

LEIDY CECILIA CARRASCO MADRID

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Medicina Preventiva
Animal

PROFESOR GUÍA
CARLOS NAVARRO VENEGAS

FINANCIAMIENTO
PROGRAMA AUCAI
UNIVERSIDAD DE CHILE

SANTIAGO – CHILE
2010

I . ÍNDICE DE CONTENIDOS

		Pág.
I.	ÍNDICE DE CONTENIDOS	1
II.	ÍNDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS	3
III.	RESUMEN	4
IV.	SUMMARY	5
1.	INTRODUCCIÓN	6
2.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1	Antecedentes	7
2.2	Clasificación	7
2.3	Estructura viral	11
2.4	Replicación viral	12
2.5	Características de infección	13
2.6	Patogenia	15
2.7	Enfermedades asociadas	16
a)	Recién nacidos menores de cuatro semanas	16
b)	Cachorros mayores de cuatro semanas	17
c)	Adultos	17
2.8	Diagnóstico	18
a)	Diagnóstico clínico	18
b)	Diagnóstico de laboratorio	18
2.9	Prevención	24
2.10	Tratamiento	25
2.11	Situación en Chile	27
2.12	Glicoproteína B	29
3.	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo General	31
3.2	Objetivos Específicos	31

		Pág.
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	32
4.1	Reactivación del aislado viral RP5	32
4.2	Detección parcial del gen de la glicoproteína B (gB) de CaHV1 mediante PCR	32
a)	Obtención de ADN viral	32
b)	Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)	33
c)	Mezcla de la reacción	34
d)	Amplificación del ADN	34
e)	Visualización de productos amplificados	35
f)	Medidas de bioseguridad	35
4.3	Determinación de la concentración viral mínima detectable por PCR convencional	35
4.4	Determinación del porcentaje de identidad nucleotídica respecto del GenBank®	35
a)	Secuenciación	35
b)	Análisis	36
5.	RESULTADOS	37
5.1	Detección parcial del gen de la glicoproteína B (gB) de CaHV1 mediante PCR	37
5.2	Determinación de la concentración viral mínima detectable por PCR convencional	37
5.3	Determinación del porcentaje de identidad nucleotídica respecto del GenBank®	38
6.	DISCUSIÓN	40
7.	CONCLUSIONES	44
8.	ANEXOS	45
9.	BIBLIOGRAFÍA	61

II. ÍNDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS

CUADROS		Página
Cuadro 1	Virus herpes que provocan enfermedad en animales domésticos	9
Cuadro 2	Virus herpes que provocan enfermedad en animales domésticos	10
Cuadro 3	Características de algunos inhibidores de nucleósidos	26
Cuadro 4	Porcentaje de identidad nucleotídica de la gB de diez tipos de virus herpes	29
Cuadro 5	Porcentaje de identidad nucleotídica del aislado RP5	39
FIGURAS		
Figura 1	Efecto citopático producido por la cepa F-205V (hoy CaHV1), en células renales de perro	8
Figura 2	Partículas virales de CaHV1 teñidas negativamente	11
Figura 3	Esquema del genoma de CaHV-1	12
Figura 4	Inactivación de la cepa F-205V (hoy CaHV1) por calor a 56°C y 36°C	13
Figura 5	Patogenia del CaHV1	16
Figura 6	Cuerpos de inclusión intranucleares en corte histológico de riñón	20
Figura 7	Esquema de la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)	22
Figura 8	Efecto citopático provocado por aislado RP5 en (A) células de cultivo primario de riñón canino, (B) células de la línea MDCK	27
Figura 9	Inmunofluorescencia directa. Reacción positiva de la línea MDCK infectadas con RP5	28
Figura 10	Curva de crecimiento (un paso) del aislado RP5. 0-72 horas post-inoculación	28
Figura 11	Detección parcial del gen de la glicoproteína B (gB) de CaHV1	37
Figura 12	Determinación de la concentración mínima detectable por la prueba de PCR para fragmento menor	38
Figura 13	Cladograma de la comparación nucleotídica de glicoproteína B de diez virus herpes más el amplificado LCM	42

III. RESUMEN

El virus herpes canino tipo 1 (CaHV1) provoca una enfermedad hemorrágica mortal en cachorros menores de cuatro semanas, mientras que en cachorros mayores de cuatro semanas produce algunos signos clínicos de menor gravedad como rinitis, faringitis o conjuntivitis. En adultos, es capaz de producir afecciones oculares y trastornos en la reproducción, y es un patógeno participante de la denominada “tos de las perreras”.

El gen que codifica para gB, una glicoproteína presente en la envoltura viral, se encuentra descrito en una gran variedad de virus herpes, debido a que es esencial para el proceso de ingreso del virus a la célula y así definir la ruta de neuroinvasión.

Este trabajo se realizó en los laboratorios de Virología y Microbiología del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y su propósito fue contribuir a la caracterización molecular del aislado viral RP5, y confirmar la presencia de un virus herpes nativo, mediante la detección del gen de la glicoproteína B usando la reacción de la polimerasa en cadena (PCR).

Los resultados obtenidos permiten demostrar una alta sensibilidad de la técnica implementada y una especificidad superior a otro protocolo de PCR implementado en otra memoria de título. Así, un porcentaje de identidad nucleotídica de 97% respecto de la secuencia publicada en GenBank permite calificar este protocolo como un serio aspirante a convertirse en un método diagnóstico para CaHV1 en Chile y por otra parte concluye que el aislado RP5 nativo corresponde a CaHV1.

Finalmente, con este estudio confirmatorio el aislado RP5 podrá ser nombrado oficialmente como AFLC-61, la cepa chilena de CaHV1.

IV. SUMMARY

The canine herpesvirus type 1 (CaHV1) causes fatal hemorrhagic disease in puppies less than four weeks, while in four weeks older puppies it produces some minor clinical signs such as rhinitis, pharyngitis, or conjunctivitis. In adults, is capable to producing eye disease and reproductive disorders, and it is a participant pathogen called "kennel cough".

The gene coding for gB, a glycoprotein present in the viral envelope, is described in a great variety of herpes virus, because it is essential to the process of entry of virus into the cell and thus define the route of neuroinvasion.

This work was conducted in the laboratory of Virology and Microbiology, Department of Animal Preventive Medicine, Faculty of Veterinary and Animal Sciences, University of Chile and its purpose was to contribute to the molecular characterization of isolated viral RP5, and confirm the presence of a herpes native virus, by detecting the glycoprotein B gene by polymerase reaction chain (PCR).

The results allow demonstrating a high sensitivity of the technique implemented and a high specificity than other PCR protocol implemented in other title memory. Thus, a percentage of nucleotide identity of 97% compared to the sequence published in GenBank allows the qualification of this protocol as a serious contender to become a diagnostic method for CaHV1 in Chile and on the other hand it concludes that the isolated native RP5 corresponds to CaHV1.

Finally, with this confirmatory study isolate RP5 could be officially named as AFLC-61, the Chilean strain of CaHV1.

1. INTRODUCCIÓN

Los virus son agentes infecciosos diferentes a los microorganismos y se caracterizan por poseer sólo un tipo de ácido nucleico y porque para la replicación de su genoma y de sus simples o elementales estructuras, dependen totalmente de la célula hospedera. Como es sabido, los virus se encuentran en el límite de lo vivo y lo inanimado: no se consideran seres vivos, porque no cuentan con capacidad autopoyética. Así, para lograr la producción de sus propias proteínas, suplantando los genes celulares, bloqueando la síntesis de las proteínas de la célula hospedera.

Los virus, fuera de la célula son considerados inertes, debido a que son capaces de replicarse sólo cuando están en su interior. Algunos virus son citolíticos, es decir producen un daño en la membrana celular de la célula infectada que conduce a la muerte celular, efecto visible al microscopio óptico.

Dentro de los virus que exhiben esta característica se encuentran los virus herpes, que han sido descritos en insectos, reptiles, anfibios, moluscos y, prácticamente en todas las especies de aves y mamíferos en que se han investigado.

Uno de los virus herpes de interés veterinario, es el virus herpes canino tipo 1 (CaHV1) ya que su persistencia en un criadero canino, provoca pérdidas considerables que pueden amenazar la supervivencia económica de este tipo de empresas, por lo cual resulta imprescindible realizar un diagnóstico precoz.

En este contexto, este estudio mediante el uso de la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR) permitió la detección de dos fragmentos del gen de la glicoproteína B del virus CaHV1 en un aislado chileno denominado RP5. La secuenciación de uno de los fragmentos del gen permite aseverar –dada una identidad nucleotídica de 97%– que el fragmento de ADN amplificado corresponde a parte del gen de la Glicoproteína B del virus. Esto último contribuye tanto a la caracterización molecular del aislado RP5 como a la obtención de una cepa control positivo para la instauración de un método diagnóstico definitivo para el virus herpes canino tipo 1 en Chile.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antecedentes

El virus herpes canino tipo 1 (CaHV1), fue aislado originalmente a partir de un caso de mortalidad de aparición brusca en una camada canina y descrito por primera vez en Estados Unidos de Norteamérica, como causante de una enfermedad hemorrágica mortal en cachorros menores de 4 semanas (Carmichael *et al.*, 1965).

En adultos, el CaHV1 causa infecciones de la mucosa externa del aparato genital y ha sido asociado con una leve vaginitis vesicular. Además, es uno de los agentes participantes del síndrome respiratorio denominado “tos de las perreras”, que corresponde a una traqueobronquitis (Carter *et al.*, 2006).

Actualmente, se ha descrito su presencia a nivel mundial (Geldard *et al.*, 1971; Hashimoto *et al.*, 1978; Galosi, 2007; Gongora *et al.*, 2007).

2.2 Clasificación

El CaHV1 pertenece a la familia *Herpesviridae*, Subfamilia *Alphaherpesvirinae*, Género *Varicellovirus* (ICTV, 2009), esta familia junto a otras dos conforman un orden nuevo: *Herpesvirales*, que actualmente incluye 3 familias, 4 subfamilias, 17 géneros y 90 especies (Davison, 2010).

La familia *Herpesviridae* está compuesta por un gran número de virus que provocan diversidad de enfermedades, tanto en humanos como animales (Madigan *et al.*, 2003). La familia *Herpesviridae* está conformada por cuatro subfamilias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, *Gammaherpesvirinae* y una cuarta todavía sin nombre (ICTV, 2009). Esta división fue establecida originalmente por características biológicas, pero en general, concuerda con determinaciones moleculares posteriores, incluyendo la secuenciación de nucleótidos y el análisis filogenético (Murphy *et al.*, 1999; Davison, 2002). Actualmente, existe más información disponible sobre la secuencia de herpesvirus que de cualquier otra familia de virus ADN (Davison, 2002).

La subfamilia *Alphaherpesvirinae* incluye virus que realizan ciclos líticos en las células que infectan, son de propagación rápida y poseen un amplio rango de hospedaderos, produciendo infecciones latentes, especialmente en los linfonódulos sensoriales (Boehmer y Lehman, 1997; Carmichael y Green, 1998). Asimismo, tienen la capacidad de persistir latentes en el hospedador por largos períodos de tiempo y activarse solamente bajo condiciones de estrés (Madigan *et al.*, 2003). El efecto citopático (ECP) que producen se caracteriza por el redondeamiento y desprendimiento de las células en cultivo. Inducen la formación de cuerpos de inclusión intranucleares acidófilos o basófilos (Figura 1). La formación de sincicios (células gigantes) es rara (Carmichael y Green, 1998).

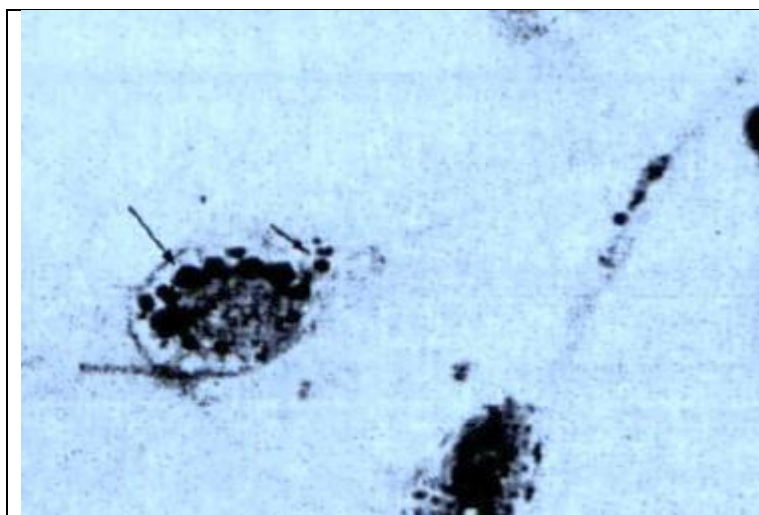


Figura 1

Efecto citopático producido por la cepa F-205V, en células renales de perro. Las flechas muestran cuerpos intranucleares (Carmichael *et al.*, 1965).

La subfamilia *Betaherpesvirinae* comprende los citomegalovirus de muchas especies, los cuales poseen una elevada especificidad y la subfamilia *Gammaherpesvirinae* se asocia a virus linfotrópicos (Murphy *et al.*, 1999). Los cuadros 1 y 2 contienen los virus herpes que producen enfermedades en los animales domésticos, ordenados por subfamilia, género y enfermedad asociada (Murphy *et al.*, 1999; Carter *et al.*, 2006; Davison *et al.*, 2009; Davison, 2010).

Dentro de la subfamilia *Alphaherpesvirinae* se encuentran cinco Géneros: *Iltovirus*, *Mardivirus*, *Simplexvirus*, *Varicellovirus* y un quinto todavía sin nombre (ICTV, 2009). En el género *Varicellovirus* se encuentran la mayoría de los herpesvirus de importancia veterinaria (Carter *et al.*, 2006).

Cuadro 1

Virus herpes que provocan enfermedad en animales domésticos

GÉNERO	ESPECIE	ENFERMEDAD ASOCIADA
Subfamilia <i>Alphaherpesvirinae</i>		
<i>Iltovirus</i>	Virus herpes aviar 1 (GaHV1)	Laringotraqueitis infecciosa de los pollos
	Virus herpes psitácido 1 (PsHV1)	Enfermedad de Pacheco
<i>Mardivirus</i>	Virus herpes aviar 2 (GaHV2)	Enfermedad de Marek tipo 1
	Virus herpes aviar 3 (GaHV3)	Enfermedad de Marek tipo 2
	Virus herpes meleagrid 1 (MeHV1)	Herpesvirosis del pavo
<i>Simplexvirus</i>	Virus herpes bovino 2 (BoHV2)	Mamilitis ulcerativa bovina; enfermedad pseudo-“lumpskin”
<i>Varicellovirus</i>	Virus herpes bovino 1 (BoHV1)	Rinotraqueitis infecciosa bovina; vulvovaginitis pustular infecciosa; balanopostitis infecciosa; abortos
	Virus herpes bovino 5 (BoHV5)	Encefalitis
	Virus herpes caprino 1 (CpHV1)	Conjuntivitis; enfermedad respiratoria y entérica
	Virus herpes porcino 1 (SuHV1)	Pseudorrabia o enfermedad de Aujeszky
	Virus herpes equino 1 (EHV1)	Abortos; mortalidad perinatal; enfermedad respiratoria; enfermedad neurológica
	Virus herpes equino 3 (EHV3)	Exantema coital
	Virus herpes equino 4 (EHV4)	Rinoneumonitis
	Virus herpes canino 1 (CaHV1)	Enfermedad hemorrágica de los cachorros
	Virus herpes felino 1 (FHV1)	Rinotraqueitis viral felina

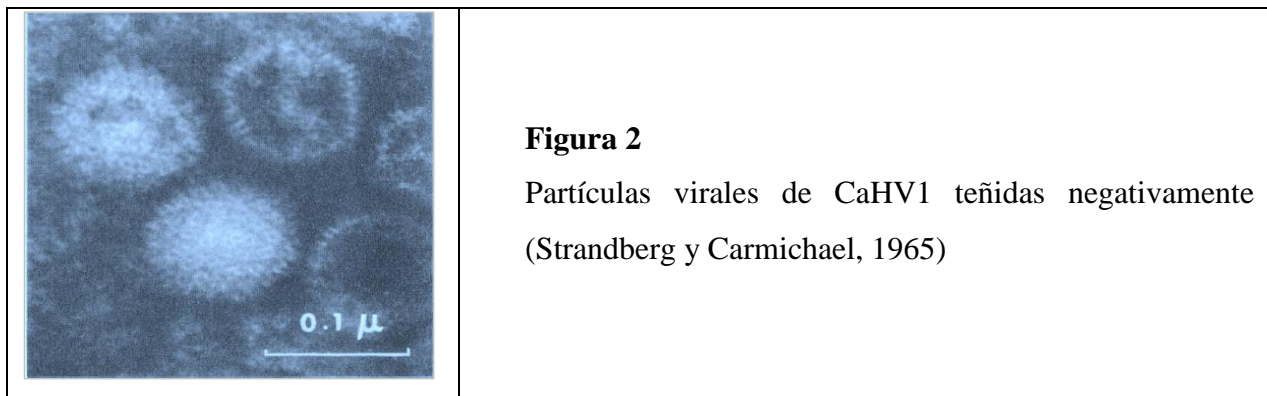
Cuadro 2

Virus herpes que provocan enfermedad en animales domésticos

GÉNERO	ESPECIE	ENFERMEDAD ASOCIADA
Subfamilia <i>Betaherpesvirinae</i>		
Sin asignar	Virus herpes porcino 2 (SuHV2)	Rinitis; infección por citomegalovirus generalizada
	Virus herpes cavia 2 (CavHV2)	Citomegalovirus en conejillo de indias
Subfamilia <i>Gammaherpesvirinae</i>		
<i>Macavirus</i>	Virus herpes bovino 6 (BoHV6)	Herpesvirus linfotrópico
	Virus herpes caprino 2 (CpHV2)	Herpesvirus caprino
	Virus herpes ovino 2 (OvHV2)	Fiebre catarral maligna
	Virus herpes porcino 3 (SuHV3)	Herpesvirus linfotrópico
	Virus herpes porcino 4 (SuHV4)	Herpesvirus linfotrópico
	Virus herpes porcino 5 (SuHV5)	Herpesvirus linfotrópico
<i>Percavirus</i>	Virus herpes equino 2 (EVH2)	Infección por gammaherpes equino
	Virus herpes equino 5 (EVH5)	Herpesvirosis
<i>Rhadinovirus</i>	Virus herpes bovino 4 (BoHV4)	Herpesvirosis
Sin asignar	Virus herpes equino 7 (EVH7)	Herpesvirosis asnal
Sin nombre		
Sin asignar	Virus herpes anatide 1 (AnHV1)	Enteritis en patos
	Virus herpes ovino 1 (OvHV1)	Adenomatosis pulmonar de la oveja

2.3 Estructura viral

El genoma de los viriones de la familia *Herpesviridae* consta de una molécula lineal de ADN de doble hebra, con un tamaño que oscila entre los 125 y los 235 mil pares de bases (pb), con un peso molecular de 63×10^6 daltons (Lust y Carmichael, 1974). Rodeando al genoma se encuentra una cápside de simetría icosaédrica (162 capsómeros) y un tamaño aproximado de 125 nm. Enseguida se encuentra un complejo de proteínas virales, de estructura fibrilar, denominada tegumento. Finalmente existe una envoltura lipídica, derivada de la célula hospedadora, en cuya superficie externa se encuentran proyecciones pequeñas distribuidas uniformemente, como son las proteínas y las glicoproteínas. La estructura final de la partícula viral tiene un tamaño que varía entre 120 y 300 nm (Madigan *et al.*, 2003; Carter *et al.*, 2006). Mediante microscopía electrónica es posible verificar su forma (Figura 2) (Strandberg y Carmichael, 1965).



En particular, el genoma de CaHV1 es de aproximadamente 128 kpb (Rémond *et al.*, 1996), siendo característico su bajo porcentaje de guanina y citosina (33%) (Plummer *et al.*, 1969). Este genoma posee dos regiones no repetidas: U_L (*unique long*) que comprende el 84% del genoma y U_S (*unique short*) correspondiente al 16% restante del genoma, que en conjunto codificarían al menos 75 proteínas. Ambas regiones están unidas por secuencias repetidas terminales. La región U_L tiene alrededor de 100.000 pb y está flanqueada por 37 pb de secuencia repetida invertida. La región U_S está compuesta por 7400-8600 pb flanqueada por 10100-10700 pb de secuencia repetida invertida (Figura 3) (Rémond *et al.*, 1996).

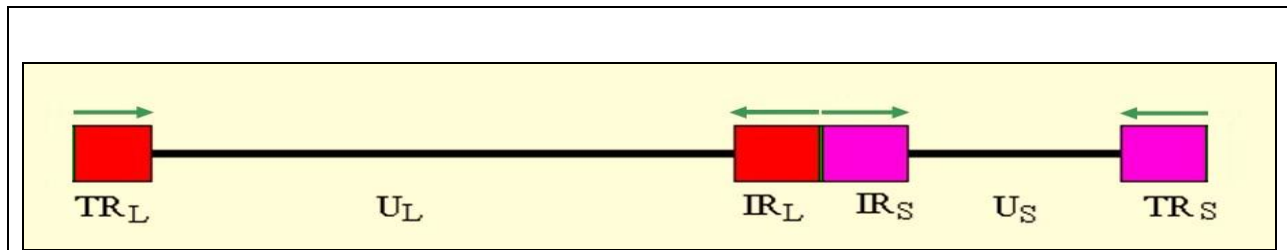


Figura 3

Esquema del genoma de CaHV-1. Se muestran las dos regiones o secuencias no repetidas del genoma (U_L y U_S) y las regiones terminales TR_{LS} e intermedias IR_{LS} de cada una de ellas (repetidas e invertidas) (Fenner *et al.*, 1992 modificado).

2.4 Replicación viral

Al interior de la célula se produce la replicación del virus, que corresponde a la capacidad del virus para estimular a la célula hospedadora a sintetizar todos los elementos necesarios para elaborar viriones. Las fases de este proceso se resumen en 5 etapas: adsorción, penetración, síntesis de ácido nucleico y proteínas, ensamblaje y finalmente liberación (lisis) (Murphy *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 2003).

La adsorción se caracteriza por su alta especificidad; las proteínas del virus interactúan con receptores de la célula, lo cual determina las células susceptibles de ser infectadas. Sin embargo, la fijación e incluso la penetración de una célula susceptible no garantiza la multiplicación viral, pues para que ocurra la replicación deben surgir nuevas copias del genoma viral y sintetizarse proteínas específicas del virus (Madigan *et al.*, 2003). En la replicación viral se producen tres clases de RNAm: el temprano inmediato (α) que codifica cinco proteínas reguladoras; el temprano retardado (β) que codifica proteínas relacionadas con la replicación del ADN, incluyendo la timidin kinasa y el tardío (γ) que codifica proteínas estructurales de la partícula viral. Las proteínas sintetizadas se clasifican en dos categorías: proteínas tempranas, las cuales son sintetizadas inmediatamente después de la infección y son necesarias para la replicación del ácido nucleico viral; y proteínas tardías, las que son sintetizadas más tarde e incluyen las glicoproteínas de la cubierta del virus (Murphy *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 2003).

La síntesis del ADN viral y de la cápside ocurre en el interior del núcleo de la célula hospedera y de la cual adquiere la envoltura. El virus es transportado a través del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi hasta la membrana citoplasmática de la célula hospedadora donde es liberado o bien, permanece en su interior en estado de latencia (Carmichael y Green, 2000).

2.5 Características de infección

La herpesvirosis canina está extendida por todo el mundo, especialmente en colectividades caninas, albergues, hoteles caninos, tiendas de animales y particularmente en criaderos; en estos últimos, la seroprevalencia puede superar el 90% y la mitad de los animales seropositivos presentan trastornos reproductivos (Dumon y Mimouni, 2005).

El virión del virus herpes es frágil y su baja resistencia se debe a su envoltura glicoproteica y lipídica la cual es fácilmente destruida por el calor, los rayos ultravioletas, los solventes de lípidos (cloroformo, éter) y los desinfectantes comunes (cloramina, formaldehído, derivados fenólicos, compuestos de amonio cuaternario) (Anexo 1) (Murphy *et al.*, 1999). Su multiplicación es óptima entre 32°C y 33°C, observándose una replicación rápida con lisis de las células infectadas. Sin embargo, se inactiva fácilmente a temperaturas superiores a 40°C (Dumon y Mimouni, 2005; Carmichael *et al.*, 1965)(Figura 4).

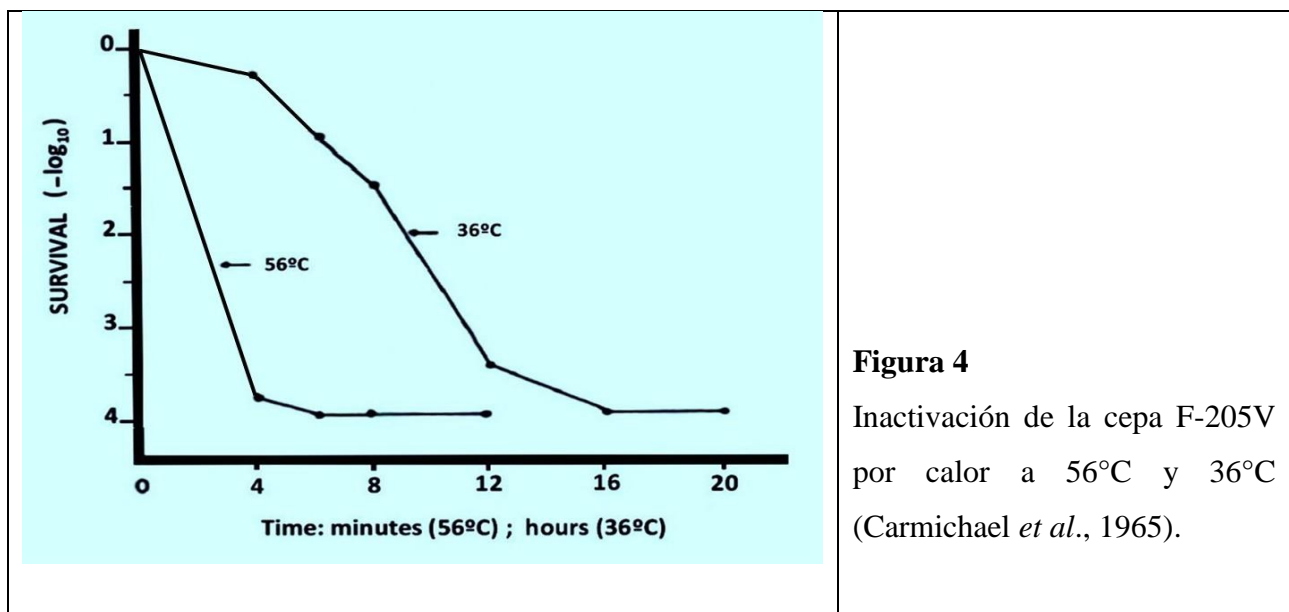


Figura 4
Inactivación de la cepa F-205V por calor a 56°C y 36°C (Carmichael *et al.*, 1965).

La transmisión requiere de un contacto estrecho entre los individuos a través de mucosas: mediante el coito, lamidos y caricias de las madres. En poblaciones confinadas (criaderos) la propagación por aerosoles es el principal modo de transmisión (Murphy *et al.*, 1999).

Hasta ahora, el CaHV1 ha sido aislado de especies pertenecientes a la familia de los cánidos. Sin embargo, estudios demuestran la detección de anticuerpos en mustélidos como las nutrias de río (*Lontra canadensis*) en América del Norte (Kimber *et al.*, 2000).

La inmunidad humoral (producción de anticuerpos neutralizantes orientados principalmente contra las glicoproteínas virales) y celular (orientada por la presencia de antígenos víricos expresados sobre la superficie de las células infectadas) es fundamental en la patogenia de CaHV1, pues ninguna de las dos posee acción alguna sobre el virus presente en neuronas infectadas de forma latente, ni tampoco logran evitar la salida a través de los nervios sensitivos hacia los lugares de infección en los epitelios (Fenner *et al.*, 1992). La gran susceptibilidad a la infección por CaHV1 que presentan los cachorros menores de tres semanas, se debería básicamente a la incapacidad de regular su temperatura corporal, a la carencia de anticuerpos procedentes de la madre y a la inmadurez de su sistema inmune (Carmichael *et al.*, 1969).

Se describen además, sistemas accesorios que permiten ocupar nichos biológicos y superar inconvenientes presentados por sus hospedadores. Estos sistemas están conformados en cuatro grupos principales (Davison *et al.*, 2002):

- Presentar tropismo celular específico. El virus herpes se caracteriza por su tropismo hacia la mucosa del tracto respiratorio superior, la mucosa genital, el SNC y el endotelio vascular (Carmichael y Green, 2000).
- Lograr el control de la maquinaria celular. Los virus redireccionan las funciones metabólicas del hospedador en favor de su propia replicación (Madigan *et al.*, 2003).
- Manipular o eludir al sistema inmune. Uno de los mecanismos descritos y utilizados por el virus herpes para evitar su erradicación consiste en provocar una interferencia en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I, cuya función radica en el procesamiento y presentación de antígenos citoplasmáticos (Griffin *et al.*, 2010).

- Realizar latencia. Se ha demostrado que el CaHV1 hace latencia en los linfonódulos del trigémino, tonsilas, glándulas salivales, diversos linfonódulos como submandibulares, retrofaríngeos, pulmonares y mesentéricos; hígado, riñones, bazo y tallo cerebral (Burr *et al.*, 1996).

2.6 Patogenia

En los recién nacidos, la multiplicación primaria se realiza en la mucosa nasofaríngea y tonsilas, seguido por una invasión a los linfonódulos regionales (Figura 5). La viremia se asocia a células mononucleares, seguida por la hiperplasia y necrosis linfoide del bazo y linfonódulos profundos como mediastínicos, ilíacos y mesentéricos. La infección del endotelio vascular debido a la necrosis provoca la aparición de lesiones como hemorragias y necrosis dispersas en los órganos principales. (Schulze y Baumgärtner, 1998; Carmichael y Green, 2000).

Los cachorros mayores de cuatro semanas y los adultos son considerados animales inmuno competentes, pues su temperatura corporal es superior a la que se requiere para la multiplicación óptima del virus, fundamentalmente en el tracto respiratorio superior y tracto genital (Figura 5).

Posterior a la infección oronasal, se observa replicación viral en la nasofaringe, amígdalas y linfonódulos regionales y se puede manifestar una viremia asociada a monocitos y linfocitos. Después de la infección local, el virus es diseminado o permanece latente. Mediante la técnica de PCR se ha demostrado la presencia del virus en estado de latencia en diversos linfonódulos y en importantes órganos como hígado, riñones y bazo (Burr *et al.*, 1996).

En la supervivencia de cachorros infectados es importante la inmunidad adquirida de la madre. Así, cuando los cachorros amamantados por madres seronegativas se infectan con CaHV1, desarrollan la forma superaguda que es mortal. En cambio, cuando los infectados son cachorros amamantados por madres seropositivas permanecen asintomáticos y el virus puede ser aislado desde la región orofaríngea (Carmichael y Green, 2000).

La crianza en perreras es considerada como uno de los principales factores de riesgo que afectan el título de anticuerpos contra CaHV1 (Ronsse *et al.*, 2004). Se observa un aumento significativo

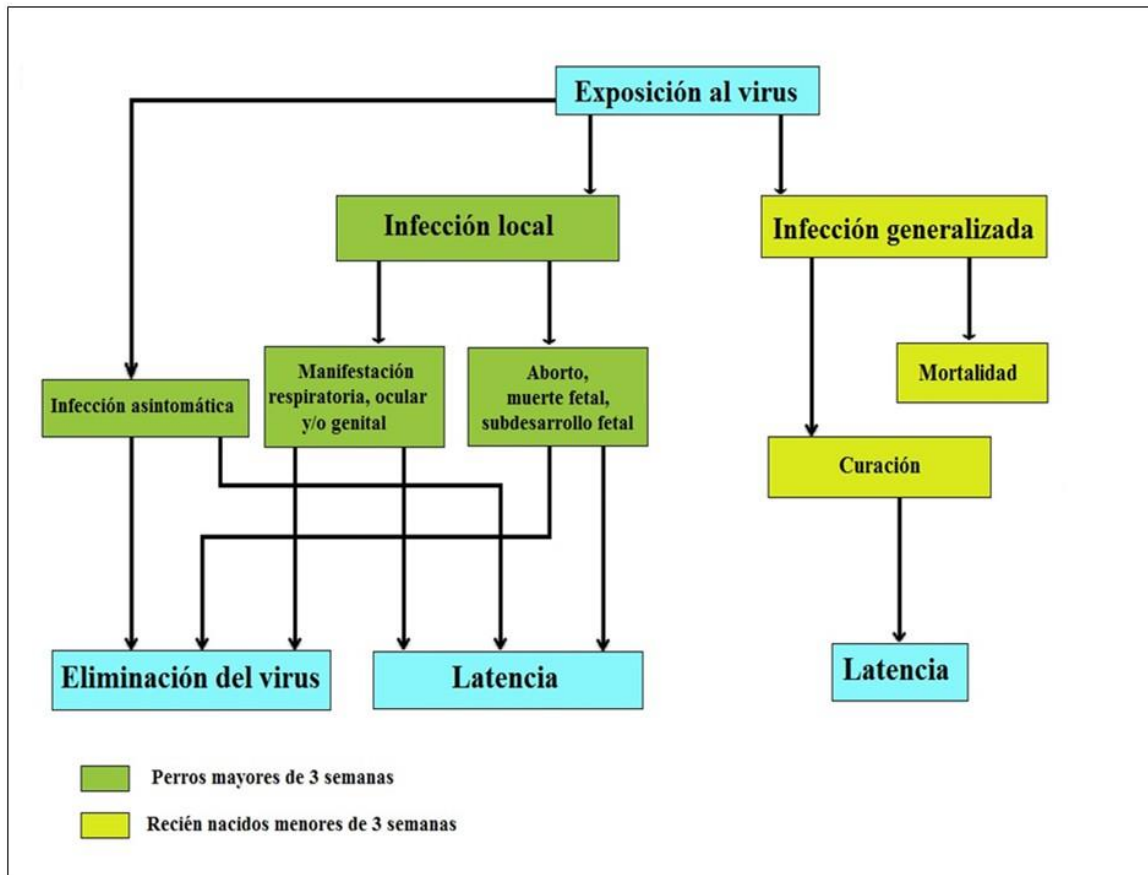


Figura 5: Patogenia del CaHV1 (Ronsse *et al.*, 2003 modificado).

en estos títulos con la edad (Lacheretz y Cognard, 1998; Ronsse *et al.*, 2004). Como factores relacionados se han observado títulos elevados de anticuerpos en cuadros de tos de las perreras y uso de machos externos para la reproducción. Frente a la presencia de tos de las perreras y una deficiente higiene se observa una tendencia al aumento del título de anticuerpos tanto en hembras como en machos (Ronsse *et al.*, 2004).

Tanto el sexo como la asistencia a exposiciones no afectarían el título de anticuerpos, así como el número de camadas no presentaría ningún efecto significativo (Ronsse *et al.*, 2004).

2.7 Enfermedades asociadas.

a) **Recién nacidos menores de cuatro semanas.** El CaHV1 provoca una enfermedad breve pero severa, que se caracteriza por una viremia y un 80% de mortalidad en animales menores a una

semana. La severidad de la enfermedad está relacionada con (a) incapacidad de regular adecuadamente la temperatura corporal, pues los cachorros al nacer son relativamente inmaduros respecto de los centros termorreguladores hipotalámicos, (b) incapacidad de desarrollar una respuesta febril a la infección y (c) inmadurez de su respuesta inmune.

Una vez que esta capacidad se desarrolla (2-3 semanas de edad), los cachorros se vuelven resistentes a las infecciones generalizadas, debido a que el virus no se replica eficientemente a temperaturas superiores a 36°C. Paralelamente, en los cachorros ocurre la madurez inmunológica, traducida en la adquisición de algunos mecanismos de inmunidad innata: inhibición de la infección por los interferones (IFN) de tipo I y la destrucción de las células infectadas por las células asesinas naturales (NK) (Abbas *et al.*, 2002; Carter *et al.*, 2006). Los pocos animales sobrevivientes quedan con secuelas cerebelosas y articulares irreversibles (Dumon y Mimouni, 2005; Carter *et al.*, 2006).

Existen dos formas de presentación: una forma superaguda definida por una mortalidad fulminante asintomática y una forma aguda (la más habitual) que comienza con trastornos digestivos, anorexia, heces líquidas de color grisáceo, vómitos y quejidos continuos por dolor abdominal; más tarde aparecen síntomas nerviosos de encefalomiелitis seguidos de coma y muerte (Murphy *et al.*, 1999; Dumon y Mimouni, 2005). En los cachorros infectados por exposición oronasal, una lesión frecuente es la linfonóduloneuritis del nervio trigémino (Carmichael y Green, 2000). Se pueden presentar trastornos oculares como amaurosis debido a la displasia de la retina, conjuntivitis, retinitis, panuveítis, queratitis, cataratas, neuritis y sinequias anteriores periféricas (Albert *et al.*, 1976; Carmichael y Green, 2000).

- b) ***Cachorros mayores de cuatro semanas.*** El CaHV1 no provoca signos clínicos evidentes de infección o existe un desarrollo de menor gravedad de signos clínicos tales como rinitis, faringitis o conjuntivitis (Carmichael y Green, 2000).
- c) ***Adultos.*** El CaHV1 provoca distintos signos patológicos: afecciones oculares como conjuntivitis transitoria y rinofaríngeas que se manifiesta clínicamente como “tos de las perreras” (Carmichael y Green, 2000; Dumon y Mimouni, 2005). Se asocia frecuentemente con este síndrome, pero es considerado como un agente secundario, lo que queda demostrado

en su baja tasa de detección (1,46%) similar a Coronavirus respiratorio canino y virus Distemper canino (1,5%), en comparación con virus de Parainfluenza canina (7,4%) y *Bordetella bronchiseptica* (10,3%). Con esto se puede concluir, que siendo esta enfermedad producida por un gran número de agentes infecciosos, el CaHV1 es considerado como agente patógeno secundario (Kawakami *et al.*, 2010).

Los trastornos de la reproducción y las lesiones genitales son los signos más importantes en esta etapa.

Así, en hembras se describe una leve vaginitis vesicular que se caracteriza por petequias y hemorragias en submucosa con una notoria descarga vaginal (Hill y Maré, 1974). Además, las infecciones uterinas en el último tercio de la gestación pueden acabar en aborto, momificaciones, mortinatos, nacimientos de cachorros débiles o subdesarrollados e infertilidad futura (Carter *et al.*, 2006).

En machos, se describe la presencia de nódulos en la mucosa del pene, la que se vuelve rojiza y áspera, con aparición de petequias y secreción purulenta (Ronsse *et al.*, 2003; Dumon y Mimouni, 2005).

2.8 Diagnóstico

a) *Diagnóstico clínico.* Los signos clínicos y la necropsia entregan elementos de sospecha que deben confirmarse mediante exámenes complementarios de laboratorio. En un criadero se sospecha de herpesvirosis cuando aparece bruscamente mortalidad perinatal, seguida de abortos, infertilidad y en ocasiones tos de las perreras; de ahí la importancia de tener un historial del criadero (Dumon y Mimouni, 2005).

b) *Diagnóstico de laboratorio.*

Anormalidades hematológicas y bioquímicas.

No son específicas, pero en los recién nacidos afectados se observa una trombocitopenia marcada (Dumon y Mimouni, 2005) y un incremento notable de la actividad de Alanina-Aminotransferasa (ALT) (Carmichael y Green, 2000).

Aislamiento viral.

Consiste en lograr la multiplicación del virus en animales susceptibles, huevos embrionados o cultivos celulares, obteniendo como resultado la presencia o ausencia de un efecto visible en su respectivo hospedador (Fenner *et al.*, 1992). Es difícil de lograr y requiere de condiciones óptimas de cultivo, por lo general se multiplica en células de origen canino, como células de riñón (Carter *et al.*, 2006).

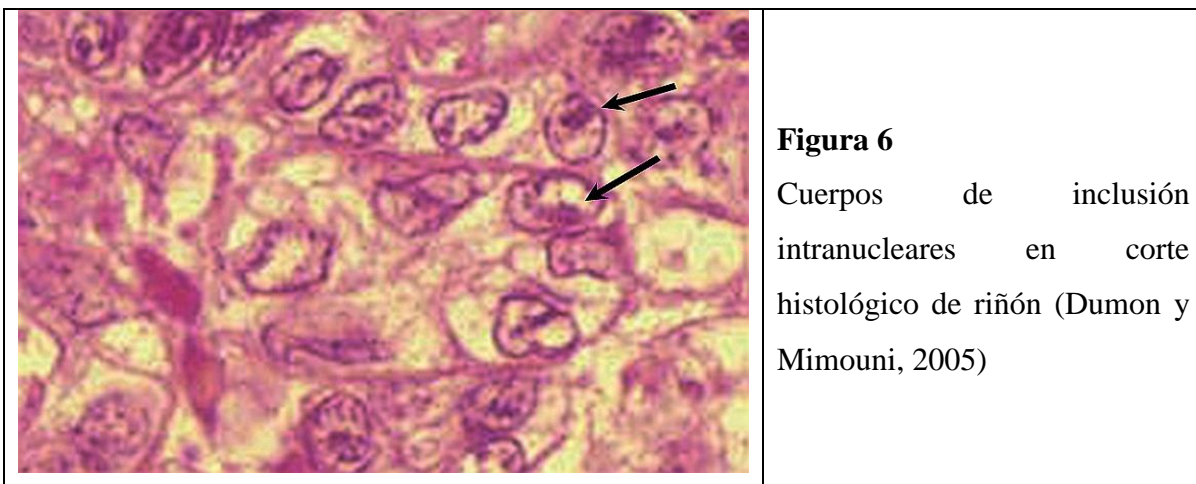
Para realizar el aislamiento viral, las muestras procedentes de recién nacidos son de preferencia a partir de riñones, hígado, pulmones, bazo, linfonódulos y glándulas suprarrenales (Carmichael y Greene, 1998). En adultos, se puede lograr a partir de hisopados nasales, vaginales o prepuciales (Carmichael y Green, 2000).

Necropsia.

Es el estudio sistemático de un animal muerto dirigido a la búsqueda de lesiones. Es una herramienta diagnóstica importante y compatible con otros procedimientos diagnósticos (Cabana, 2008). *Postmortem*, se evidencian lesiones características como petequias hemorrágicas y focos dispersos de necrosis frecuentes en hígado, bazo, pulmones y riñones (Carter *et al.*, 2006; Dumon y Mimouni, 2005; Schulze y Baumgärtner, 1998). Así, también pueden aparecer en cerebro, corazón, glándulas suprarrenales e intestino (Schulze y Baumgärtner, 1998).

Es frecuente encontrar esplenomegalia y linfadenomegalia generalizada (Carmichael y Green, 2000). A nivel histológico, se pueden observar lesiones patognomónicas de herpesvirosis como son los cuerpos de inclusión intranucleares (Figura 6). (Carter *et al.*, 2006; Dumon y Mimouni, 2005).

Para la obtención de buenas muestras y su posterior visualización, se debe realizar una necropsia precoz y la fijación inmediata en formol al 10%; deben tomarse muestras de placenta, hígado, pulmón y principalmente riñón (Dumon y Mimouni, 2005).



Métodos serológicos.

Se han desarrollado varias pruebas para detectar anticuerpos contra CaHV1, dentro de las cuáles podemos mencionar: seroneutralización (SN), inmunofluorescencia indirecta (IFI), inhibición de la hemoaglutinación (IHA) y ELISA (Xuan *et al.*, 1992). La SN se basa en el bloqueo de la multiplicación viral mediante anticuerpos específicos, lo que permite medir la capacidad de un suero de inhibir o neutralizar la infecciosidad de un virus sobre un hospedador susceptible (Fenner *et al.*, 1992). Se puede realizar un diagnóstico rápido a través de inmunofluorescencia (IF) a partir de secciones del tejido afectado (Carter *et al.*, 2006). La IFI permite visualizar, a través de un microscopio de fluorescencia, la reacción antígeno/anticuerpo mediante la fluorescencia emitida por una antiglobulina marcada (anticuerpos dirigidos contra gammaglobulinas). La IHA se basa en la unión de los anticuerpos a los receptores del virus para los eritrocitos, impidiendo que el virus adsorba a los eritrocitos; lo que permite identificar virus con capacidad hemoaglutinante y evidenciar diferencias antigénicas entre tipos de un mismo virus. Por último, la prueba de ELISA permite detectar la unión de un antígeno y un anticuerpo mediante una reacción colorimétrica asociada a la presencia de una enzima unida al anticuerpo. Así, el cambio de color del sustrato (absorbancia) puede determinarse con un espectrofotómetro (Fenner *et al.*, 1992).

A pesar de que CaHV1 es conocido como un inmunógeno débil, los niveles de anticuerpos persisten en niveles altos hasta dos meses después de la infección. Sin embargo, dependiendo

de la prueba serológica a utilizar, niveles bajos de anticuerpos se pueden detectar hasta dos años después de la infección. Los resultados obtenidos deben interpretarse con mesura, debido a que la presencia de anticuerpos no confirma una infección activa, por el contrario, animales infectados que presentan latencia pueden salir negativos a las pruebas (Carmichael y Greene, 1998). La excreción viral local, nasal o genital, no siempre se asocia con seroconversión (Hill y Maré, 1974).

Detección molecular.

Puede ser realizada mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), una técnica de gran utilidad en el área de la biología molecular. Esta técnica sensible y específica detecta parte del genoma del patógeno de interés, pudiendo utilizarse en la detección de ADN viral desde los órganos afectados (Ronsse *et al.*, 2005).

La técnica de PCR es un método para amplificar ácidos nucleicos, semejante al proceso natural de replicación de ADN (Figura 7). El número de moléculas se amplifica después de la repetición de tres pasos sucesivos (denaturación, alineación y elongación), que en conjunto forman un ciclo, bajo condiciones controladas de temperatura que van siendo modificadas por el termociclador:

(1) **Denaturación:** La molécula de ADN de cadena doble usada como molde, se denatura rompiéndose los puentes de hidrogeno de la molécula al ser incubada a alta temperatura (95°C). Las hebras ahora dissociadas, permanecerán libres hasta que la temperatura descienda lo suficiente para permitir la alineación de los oligonucleótidos usados como partidores. (2) **Alineación:** La mezcla es enfriada (45-58°C). Los oligonucleótidos sintéticos (partidores) se unen o alinean a sitios que flanquean a la región que será amplificada. Cada partidor se alinea específicamente a una de las hebras de ADN. (3) **Elongación:** se realiza a la temperatura de funcionamiento de la enzima *Taq* DNA polimerasa (72°C), la enzima comienza a replicar la hebra de ADN desde el partidor en sentido 5' → 3' (Figura 6). El empleo de una enzima termoestable, purificada a partir del microorganismo *Thermus aquaticus*, simplifica el procedimiento, ya que no pierde sustancialmente su actividad luego de cada paso de denaturación.

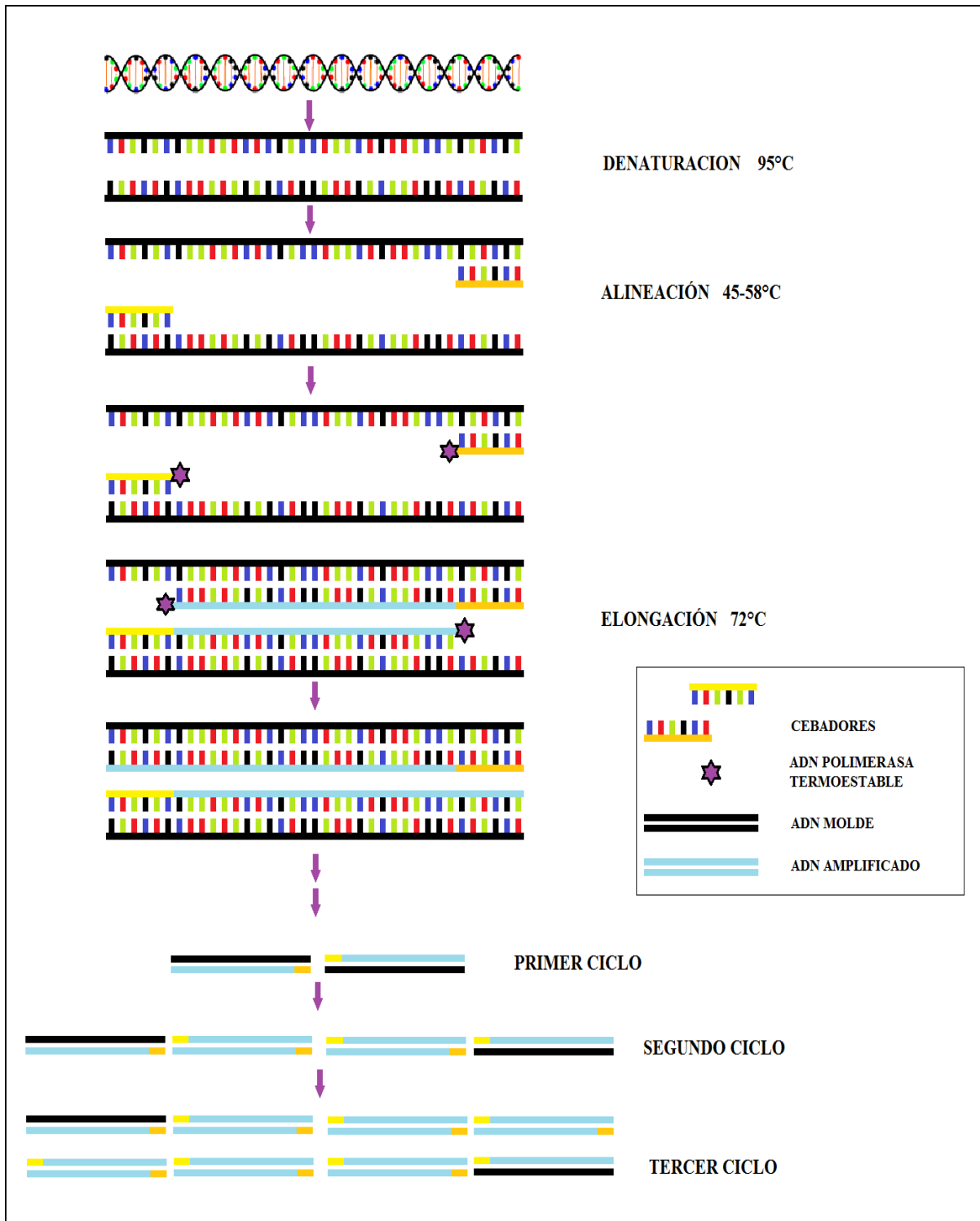


Figura 7: Esquema de la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR).

Estos tres pasos se repiten 30 o más veces con el fin de obtener millones de copias del segmento de ADN de interés, son ciclos repetidos que llevan a una síntesis exponencial de copias, lo que le otorga a la técnica una gran sensibilidad. La especificidad está dada por el uso de partidores (Mullis y Faloona, 1987).

En comparación con la técnica de PCR, la sensibilidad y especificidad para el aislamiento del virus es de 49% y 100%, respectivamente, en el caso de inmunofluorescencia indirecta es de 29% y 96%, respectivamente (Burgesser *et al.*, 1999). Es el método más confiable para descartar los falsos negativos serológicos (Dumon y Mimouni, 2005).

Existen distintos laboratorios que se han encargado de crear kit diagnósticos para virus herpes canino. En Italia, por ejemplo, el Laboratorio de Análisis Veterinario San Marco realiza la detección de herpesvirus canino mediante la técnica de PCR, a través de muestras tales como: raspado prepucial o vaginal, semen y feto abortado (Laboratorio D'Analisi Veterinarie San Marco, 2008). En EE.UU. el Laboratorio IDEXX, desde el año 2007 implementa un kit diagnóstico basado en la técnica de PCR en tiempo real para detectar en forma simultánea a los 7 agentes infecciosos involucrados en enfermedades respiratorias caninas, incluido virus herpes canino (IDEXX, 2007).

La técnica de PCR en tiempo real es una variante del PCR convencional, que involucra el uso de reactivos fluorescentes que permiten detectar el producto amplificado (ADN de hebra doble) en el momento que se sintetiza, lo cual es mostrado como una curva de formación del producto visible en una pantalla, haciendo innecesaria la utilización de una electroforesis, etapa indispensable en el PCR convencional. Adicionalmente, esta técnica permite determinar entre dos o mas muestras cual de ellas posee mayor cantidad de ADN original (Heid *et al.*, 1996).

En este mismo período Genekam Biotechnology AG en Alemania crea un kit de diagnóstico molecular listo para usar, para la detección de virus herpes canino mediante PCR convencional (Genekam, 2007).

Secuenciación.

Esta técnica permite establecer el orden de las bases nucleotídicas (A, C, G y T) en un ácido nucleico determinado (secuencia nucleotídica), gracias a esto se puede determinar la posición de cada base en el genoma viral, cuya principal utilidad es el análisis y comparación del genoma viral (Storch, 2007). Esta técnica permite comparar con posterioridad la similitud u homología con las bases de datos nucleotídicas que existen, como por ejemplo, en el GenBank®, que corresponde a una base de datos de secuencias genéticas de ADN del NIH (National Institutes of Health), una colección de acceso público que es actualizada cada dos meses. Es parte de International Nucleotide Sequence Database Collaboration, que está formada por la base de datos de ADN de Japón (DDBJ), el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) y la base de datos en el National Center for Biotechnology Information (NCBI); estas tres organizaciones intercambian datos de forma diaria. A su vez reciben secuencias genéticas producidas en laboratorios de todo el mundo (NCBI, 2003a).

2.9 Prevención

Considerando que la infección posterior producto de la latencia no se puede controlar, lo importante es evitar o limitar el desarrollo clínico de la enfermedad. Esto último se lograría a través de la reducción potencial de la infección, es decir, la disminución de la propagación viral, Así, la principal medida de prevención corresponde a la instauración de una higiene adecuada, pues el CaHV1 se inactiva con la mayoría de los desinfectantes comunes.

Otra medida de protección importante es evitar los factores de riesgo potencialmente estresantes, como la introducción de perros desconocidos en una perrera o la administración de glucocorticoides (acetato de metilprednisolona) en dosis inmunosupresoras, debido a que éstos desencadenan la recrudescencia viral (Carmichael y Green, 2000). Esto último no ha sido demostrado en otros cánidos como los zorros (*Vulpes vulpes*), en los cuales la administración de glucocorticoides no reactiva el CaHV1. Quizás esta observación podría explicarse porque los zorros portadores de CaHV1 no transmiten el virus por contacto, lo cual a su vez podría explicar la baja prevalencia de CaHV1 en zorros salvajes (Reubel *et al.*, 2004).

Una forma de lograr reducir la replicación viral, es la utilización de lámparas de calor, a fin de mantener una temperatura ambiente constante entre 38°C y 39°C, la fuente de calor debe ser instalada por encima de la cama hasta que los cachorros cumplan las tres semanas de edad (Dumon y Mimouni, 2005; Carter *et al.*, 2006). Se debe separar de las nuevas camadas, a todo perro recuperado de la infección por CaHV1, por el riesgo de actuar como reservorios de virus herpes para los recién nacidos, y cuyo único signo ocasional varíe desde una rinitis leve, vaginitis o balanopostitis (Carmichael y Green, 2000).

Una nueva vacuna inactivada, elaborada con glicoproteínas de la cepa F-205 de herpes virus canino, presenta un futuro prometedor, ya que al ser utilizada, se observaron efectos beneficiosos sobre el peso al nacer y una mayor tasa de preñez en hembras vacunadas (Poulet *et al.*, 2001). En los países de la Unión Europea se utiliza para inmunizar a las perras con Eurican Herpes 205, permitiendo que las hembras sinteticen anticuerpos contra CaHV1, los que son entregados a sus cachorros mediante el calostro. Posteriormente, cuando los cachorros son expuestos al CaHV1 pueden no contraer la enfermedad o contraerla de una forma menos grave. Eurican Herpes 205 se administra mediante dos dosis subcutáneas, la primera durante el celo de la perra o siete a diez días después de la monta y la segunda, una a dos semanas antes de la fecha esperada de parto; en cada gestación deben ser revacunadas siguiendo esta pauta debido a la baja inmunogenicidad contra CaHV1 (EMEA, 2007).

2.10 Tratamiento

La utilización de antivirales, en general, ha demostrado ser ineficaz porque la replicación viral depende del metabolismo de la célula huésped, o bien porque los virus pueden verse afectados con los antivirales sólo durante su ciclo de replicación, el que normalmente pasa desapercibido en el caso de las infecciones agudas. Muchos de ellos no se aprueban por ser tóxicos, y los aprobados se han autorizado para uso humano y aplicación limitada en perros y gatos (Green y Watson, 2000).

El uso de 5-yodo-2-desoxiuridina, como tratamiento para la infección sistémica no ha tenido éxito (Carmichael y Green, 2000); sin embargo la idoxuridina se utiliza en forma tópica para el tratamiento de infecciones oculares. El aciclovir se ha utilizado en gatos. Otro antiviral como la

ribavirina, ha limitado su uso en veterinaria por los efectos secundarios que provoca la administración vía sistémica. Por otra parte, se han obtenidos buenos resultados con la vidarabina en cachorros expuestos pero antes de que se presenten los signos (Green y Watson, 2000). En el cuadro 3 se mencionan características de algunos inhibidores de nucleósidos (Wise *et al.*, 2006).

Cuadro 3

Características de algunos inhibidores de nucleósidos.

INHIBIDOR DE NUCLEÓSIDO	TIPO DE ANÁLOGO	VIRUS BLANCO
Aciclovir	Análogo de la guanosina	Virus herpes simplex Virus varicela-zoster
Ganciclovir	Análogo de la guanosina	Citomegalovirus
Cidofovir	Análogo de la citosina	Citomegalovirus Papilomavirus humano
Vidarabina	Adenina con azúcar arabinosa	Virus herpes
Iododeoxyuridina	Análogo la timina; yodo en lugar del grupo metilo	Virus herpes simplex
Trifluorotimidina	Análogo de la timina: 3 átomos de fluorina en lugar de 3 átomos de hidrogeno	Virus herpes simplex
Azidotimidina	Análogo de la timina; grupo azida en lugar de grupo ribosa	Virus de inmunodeficiencia humana
Dideoxiinosina	Inosina carente del grupo 3'-OH	Virus de inmunodeficiencia humana
Lamivudina	Análogo de la citosina	Virus de inmunodeficiencia humana Hepatitis B virus
Abacavir	Análogo de la guanosina	Virus de inmunodeficiencia humana
Tenofovir	Análogo del monofosfato de adenosina	Virus de inmunodeficiencia humana
Ribavirina	Análogo del precursor de la guanina	Virus sincicial respiratorio Virus de la influenza B

Es posible reducir la mortalidad en la aparición de nuevos casos mediante una inyección intraperitoneal de 1 a 2 ml de suero inmune a cada cachorro. Como tratamiento empírico sirve para reducir la mortalidad dentro de la camada expuesta, pero el éxito dependerá de si existe o no una concentración adecuada de anticuerpos séricos y por otra parte, la administración debe realizarse antes del desarrollo completo de la enfermedad sistémica (Carmichael y Green, 2000).

2.11 Situación en Chile

La presencia de CaHV1 en Chile fue sugerida años atrás por la presentación de muerte perinatal, cercana al 80% en un criadero, cuyos cachorros a la necropsia, evidenciaron la presencia de petequias en riñón e hígado, así como gran cantidad de cuerpos de inclusión intranucleares eosinófilos. La infección de cultivos de la línea celular de riñón equino, presentó el efecto citopático característico de virus herpes (Larenas *et al.*, 1992). Posteriormente, en 2002, se detectó la presencia de CaHV1 obteniéndose un aislado nacional denominado RP5. Al inocular este aislado en monocapas celulares, tanto en cultivos primarios de pulmón y riñón, como en la línea celular Madin-Darby Canine Kidney (MDCK), se produjo el típico efecto citopático de lisis celular a tiempos cortos, a partir del tercer pasaje (Figura 8).

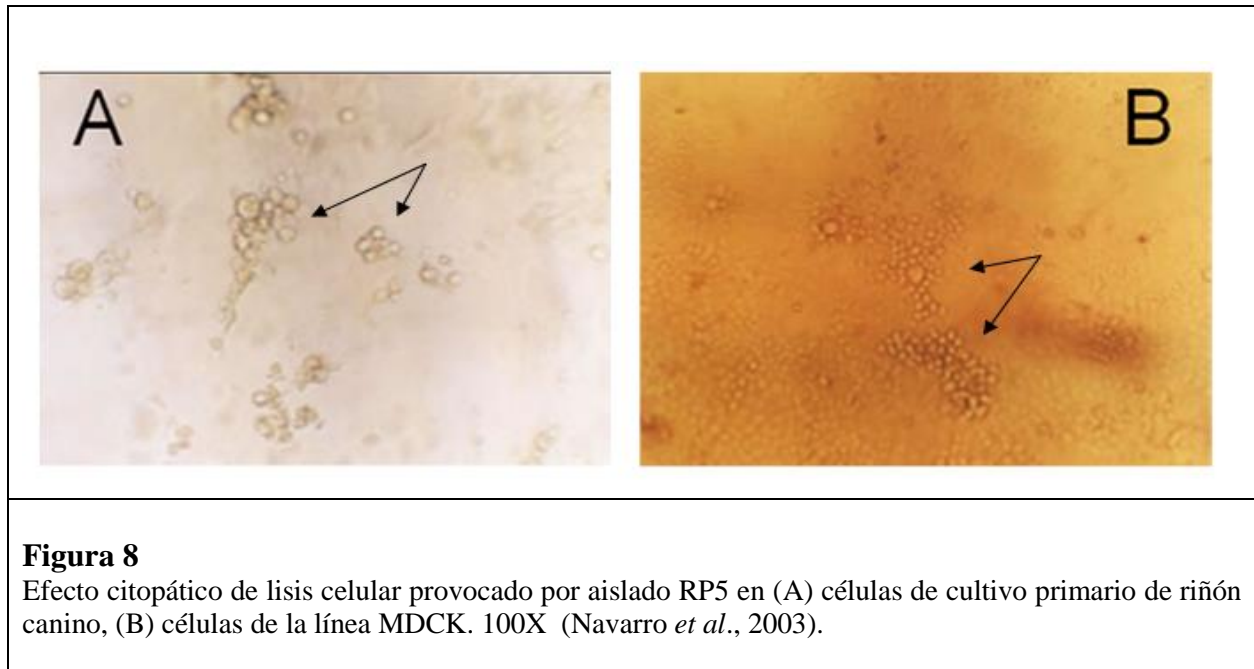


Figura 8

Efecto citopático de lisis celular provocado por aislado RP5 en (A) células de cultivo primario de riñón canino, (B) células de la línea MDCK. 100X (Navarro *et al.*, 2003).

La prueba de inmunofluorescencia directa (Figura 9) en monocapas celulares inoculadas con el aislado RP5, demostró una alta reacción entre el anticuerpo monoclonal comercial y los antígenos virales presentes en las células infectadas; confirmándose así la presencia de CaHV1 en nuestro país (Navarro *et al.*, 2003).

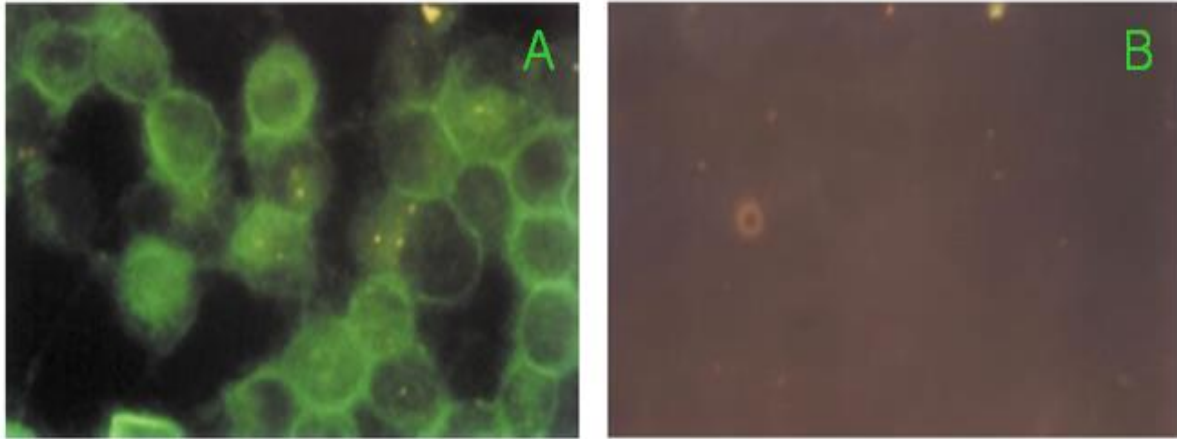


Figura 9

Inmunofluorescencia directa. (A) Reacción positiva de la línea MDCK infectadas con RP5 (B) Reaccion negativa, células MDCK sin infectar (Navarro *et al.*, 2003).

Posteriormente, este aislado se caracterizó biológicamente mediante la (a) cuantificación de la infectividad determinando el título viral ($DICT_{50} = 1,58 \times 10^6 / \text{mL}$), (b) determinación de sensibilidad frente a solvente lipídico confirmando la presencia de envoltura viral, (c) formación de cuerpos de inclusión intranucleares eosinófilos que es característico de virus herpes y (d) determinación de la velocidad de multiplicación (Figura 10), verificando un comportamiento cinético compatible con el modelo de crecimiento de un paso (Navarro *et al.*, 2005).

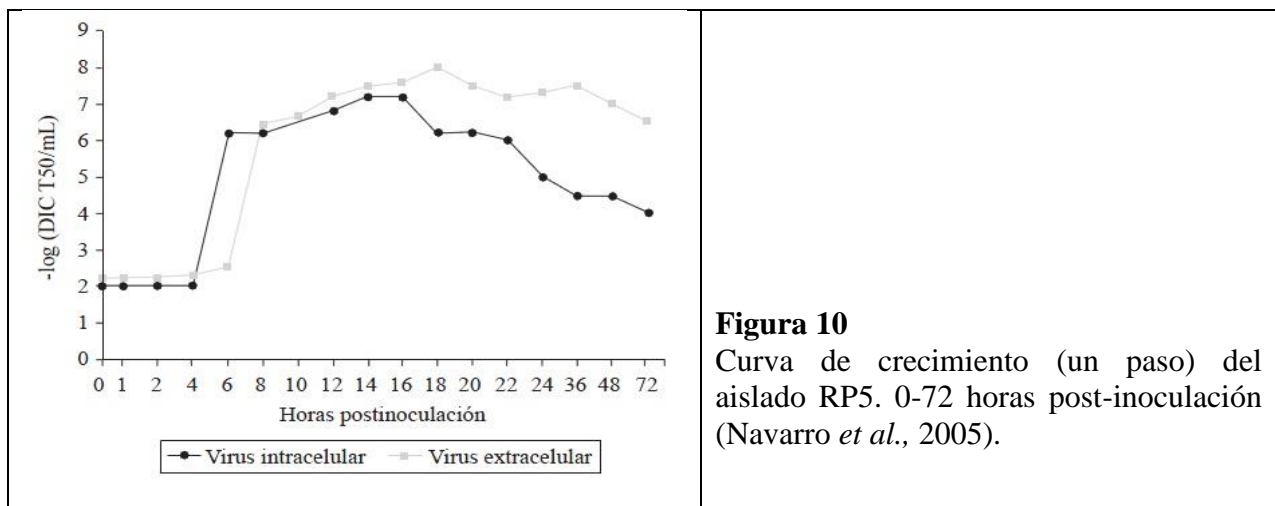


Figura 10

Curva de crecimiento (un paso) del aislado RP5. 0-72 horas post-inoculación (Navarro *et al.*, 2005).

Sin embargo, desde los últimos datos obtenidos en 2005, no se han realizado estudios para la detección molecular de este virus.

2.12 Glicoproteína B

Las relaciones antigénicas entre los virus herpes son complejas y los integrantes de la familia comparten algunos antígenos, sin embargo, las diversas especies tienen distintas glicoproteínas de envoltura (Murphy *et al.*, 1999).

Durante la infección, la respuesta inmune está dirigida hacia las glicoproteínas de la envoltura viral, ya que los anticuerpos provocan una respuesta tanto humoral como celular (Limbach *et al.*, 1994). A través de estudios realizados en virus herpes bovino (BoHV-1), se ha demostrado que la inmunización con glicoproteína B (gB) puede inducir una respuesta protectora (Babiuk *et al.*, 1987).

En estudios anteriores, se ha demostrado la similitud en la secuencia aminoacídica de gB entre 10 tipos de virus herpes. En el cuadro 4 (Anexo 2) se observan los valores que fueron obtenidos mediante el programa Clustal W 2.1.12 *on line*, y cuyos resultados son expresados como porcentaje de identidad. Este estudio reveló, además, que se conservan la mayoría de los residuos de cisteína, a excepción de aquel que se encuentra cerca de la terminal-N, debido a su capacidad para formar enlaces disulfuros que le permiten mantener la integridad estructural y funcional de las glicoproteínas. Todos estos resultados sugerirían que las gB tendrían estructuras terciarias similares (Limbach *et al.*, 1994). En virus herpes *simplex* tipo 1 (HSV-1) se comprobó que al generar un mutante, en que se intercambia la gB con la del virus de la pseudorrabia (PrV), se evidencia que la gB del PrV fue capaz de sustituir funcionalmente a gB del HSV-1 en viriones de HSV-1, lo que no ocurrió en la forma inversa (Mettenleiter y Spear, 1994).

Cuadro 4: Porcentaje de identidad nucleotídica de gB de CaHV1 y otros 9 tipos de virus herpes.

	FHV-1	EHV-1	PRV	BHV-1	VZV	MDV	HSV-1	HCMV	EBV
CaHV	73	59	53	50	64	62	51	47	43

FHV-1: Virus Herpes Felino; EHV-1: Virus Herpes Equino; PRV: Virus de la Pseudorrabia; BHV-1: Virus Herpes Bovino; VZV: Virus Varicela-Zoster; MDV: Virus Herpes de la enfermedad de Marek; HSV-1: Virus Herpes Simplex; HCMV: Citomegalovirus; EBV: Virus de Epstein-Barr.

El gen que codifica para gB es esencial tanto para el ingreso a la célula blanco en infecciones por viriones libres o por diseminación célula a célula, como también para la determinación de la ruta de neuroinvasión. Esta ruta se inicia con la entrada del virus en las terminaciones nerviosas de la periferia, se transporta hacia el cuerpo celular donde se replica, y se propaga vía transneuronal gracias a la sinapsis (Mettenleiter y Spear, 1994; Mettenleiter, 2003).

La fusión celular y la entrada del virus son dos eventos distintos, pero ambos requieren la participación de la gB. Algunos experimentos demuestran que gB no es esencial para la unión a las células, pero es necesaria para una fase posterior en la entrada del virus, es decir, en la penetración al citoplasma (Weizhong *et al.*, 1988).

Se han realizados estudios comparativos del gen de la gB de CaHV1 en países como USA, Francia, Japón y Australia, encontrándose una diferencia mínima en algunos nucleótidos (Reubel *et al.*, 2002). Algunos estudios, evidencian la importancia de la gB, por ejemplo, al realizar una sustitución de bases T-C en el codón 787, se obtiene el cambio de un solo aminoácido (Leu por Pro) en la cola citoplasmática de la glicoproteína B. Este cambio aminoacídico estaría involucrado tanto en el ingreso del virus a la célula como en la formación de sincisios, al parecer ambos eventos mediados por heparán sulfato de la célula hospedadora (Diakidi-Kosta *et al.*, 2003).

El gen de la gB codifica una proteína de 879 aminoácidos (Limbach *et al.*, 1994). Si bien el tamaño del gen gB es de 2640 pb (NCBI, 2003b) en esta Memoria de Título se implementó la detección de dos fragmentos del gen gB en el aislado RP5, uno de 1286 pb y otro de 450 pb, mediante la técnica del PCR convencional, como una aproximación a una herramienta diagnóstica útil en la detección del virus herpes canino en Chile.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir a la caracterización molecular del aislado RP5 del virus herpes canino tipo 1 en Chile

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la presencia del gen de la glicoproteína B de CaHV1 mediante PCR convencional.
- Determinar porcentaje de identidad nucleotídica de un fragmento amplificado respecto de secuencias publicadas en la base de datos GenBank®.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en los laboratorios de Virología y Microbiología del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

4.1. Reactivación del aislado viral RP5.

Aislado viral: Se utilizaron inóculos virales del aislado RP5 mantenido a -20°C en el laboratorio de la Unidad de Virología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Cultivos celulares: Se emplearon cultivos celulares de riñón canino de la línea Madin-Darby Canine Kidney (MDCK), que fueron mantenidos en frascos de cultivo (Easy Flask 75 ml, 25 cm^2) a 37°C en un medio mínimo esencial de Eagle (MEM), al que se le adicionó los antibióticos penicilina, en una dosis de 100 U/ml y estreptomina en dosis de 100 $\mu\text{g/ml}$, y suplementado con 10% de suero fetal bovino (sin CO_2).

Infección de los cultivos celulares: Se procedió a infectar los cultivos celulares MDCK con el aislado viral RP5 y éstos fueron mantenidos a temperatura entre 32° - 33°C , pues dicho intervalo constituye la temperatura óptima de replicación de este virus y se procedió a observar diariamente los frascos de cultivo (inoculados y controles sin infectar) en espera de encontrar el efecto característico de redondeamiento, lisis celular y desprendimiento celular de la monocapa, durante cinco días.

4.2. Detección parcial del gen de la glicoproteína B (gB) de CaHV1 mediante PCR.

a) Obtención de ADN viral:

Se procedió a la extracción del ADN viral a partir de las células de la línea MDCK infectadas con el aislado viral RP5, una vez alcanzado el 80% de destrucción de la monocapa celular, luego se realizaron 3 ciclos de congelamiento/descongelamiento del frasco inoculado a fin de producir la lisis de las células remanentes. Posteriormente, éstas fueron centrifugadas a $1500\times g$ por cinco minutos (Heraus Sepatech Biofuge®) y se procedió a recuperar el sobrenadante para obtener las partículas virales. Para la obtención de ADN se utilizó un kit comercial de extracción y purificación de ADN, Genomic DNA purification kit (Fermentas®) (Anexo 3). La técnica consistió en mezclar en tubos Eppendorf, con 200 μL de muestra y 400 μL de la solución de

lisis, la cual tiene como función romper la envoltura viral, dejando libre el ADN. La mezcla se incubó a 65°C durante cinco minutos, invirtiendo manualmente los tubos cada un minuto. Luego, se adicionaron 600 µL de cloroformo (Merk®), se mezcló suavemente (invirtiendo los tubos cinco veces) y se centrifugó a 10.000 rpm durante dos minutos (Heraus Sepatech Biofuge®).

En forma paralela, se preparó la solución de precipitación, mezclando 720 µL de agua libre de nucleasas (Promega®) con 80 µL del concentrado de precipitación (10X) provisto por el kit. Una vez finalizada la centrifugación, la muestra se dividió en dos fases: la fase inferior que contiene restos celulares, y la fase superior que contiene el ADN viral. La fase superior fue transferida a un nuevo tubo Eppendorf y se le adicionó 800 µL de solución de precipitación preparada con anterioridad, se mezcló suavemente a temperatura ambiente por dos minutos, centrifugando luego a 10.000 rpm durante dos minutos.

Durante la centrifugación, el ADN forma un pellet que queda en el tubo, mientras que el sobrenadante con impurezas fue removido completamente. El pellet fue disuelto con 100 µL de una solución 1,2 M de NaCl provista por el kit, y se aseguró su homogenización por medio del uso de un agitador de tubos (vórtex). Esto permitió la separación del ADN de restos de proteínas y lípidos. Luego, se agregaron 300 µL de etanol frío (-20°C) y se llevó a -20°C durante 10 minutos para lograr la precipitación del ADN. Posteriormente se centrifugó a 10.000 rpm durante cuatro minutos y se eliminó el sobrenadante. Finalmente se realizó un lavado con etanol 70% y el pellet de ADN purificado se disolvió en 100 µL de agua libre de nucleasas. Esta ADN fue utilizado inmediatamente para efectuar la técnica de PCR ó bien se almacenó a 4°C para ser usada dentro de la semana.

b) Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)

Este método para amplificar ácidos nucleicos consiste en tres pasos sucesivos que en conjunto forman un ciclo: **Partidores:** se utilizaron dos pares de partidores diseñados para amplificar fragmentos de tamaño conocido de 1286 pb (Erles *et al.*, 2004) y de 450 pb (Ronsse *et al.*, 2005) del gen gB, los que fueron sintetizados por la empresa BIOSEARCH TECHNOLOGIES, INC.

GBN3	5` - TAA TTC ATA TGT CCC CTT TTT - 3` (21 pb)
GBN4	5` - GTC CTG TAT CTT CTA ACT CTG CT - 3` (23 pb) Tamaño 1286 pb

RP1	5` - CCT AAA CCT ACT TCG GAT GA -3` (20 pb)
RP2	5` - GGC TTT AAA TGA ACT TCT CTG G -3` (22 pb) Tamaño 450 pb

La reconstitución de los partidores se realizó de acuerdo a las instrucciones del proveedor (BIOSCAN®). Para esto, se agregó un volumen de agua libre de nucleasas (Promega®), diez veces mayor a la concentración en nanomoles del partidador. De esta solución madre se tomaron 10 µL y se diluyeron en 990 µL de agua libre de nucleasas, obteniendo así la solución que se agregó a la mezcla de reacción (Anexo 4).

c) Mezcla de la reacción

Para lograr la mezcla de amplificación del ADN purificado, se utilizó un kit comercial (2X PCR Master Mix; Fermentas®), que contiene la polimerasa termoestable, los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), el buffer de reacción y MgCl₂ (Anexo 5).

En la mezcla de reacción se utilizaron 15 µL de 2X PCR Master Mix (ADN *Taq* Pol: 0,05 U/ µL; MgCl₂ : 4 mM; dNTP's: 0,4 mM), 5 µL de cada uno de los partidores (0,1 nmoles/ µL) y 5 µL de la muestra de ADN o templado (79000 DICT₅₀). Se obtuvo un volumen total de 30 µL, que se depositaron en tubos Eppendorf de 0,2 ml. Se procedió a su homogenización utilizando el vórtex para asegurar la mezcla de los reactivos.

d) Amplificación del ADN

Para la implementación de esta técnica se empleó un termociclador Apollo (CLP, USA) de 96 pocillos de 0,2 mL y un protocolo que incluye:

Partidores GBN3 y GBN4: denaturación inicial a 95°C durante dos minutos y luego 35 ciclos (denaturación a 95°C por 60 segundos; alineamiento a 45°C por 60 segundos; elongación a 72°C por 180 segundos). Finalmente una etapa de elongación a 72°C durante 10 minutos (Anexo 6).

Partidores RP1 y RP2: denaturación inicial a 94°C durante tres minutos y luego 60 ciclos (denaturación a 94°C por 50 segundos; alineamiento a 49°C por 50 segundos; extensión a 72°C por 50 segundos). Finalmente una etapa de elongación a 72°C durante 10 minutos (Anexo 6).

e) Visualización de productos amplificados

Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (®) en buffer Tris-borato (90 mM Tris-borato, 10 mM EDTA) como solvente. El producto de PCR se mezcló (6:1) con un producto comercial de carga (6X Mass Ruler Loading Dye Solution, Fermentas®) (Anexo 7), que posee glicerol para dar densidad a la muestra y azul de bromofenol para chequear el progreso de la migración de las bandas de ADN. Una alícuota de 6 µL de esta mezcla se depositó en el pocillo respectivo del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V por 40 minutos. Como marcador de tamaño molecular se utilizó un estándar que contiene fragmentos de ADN entre 100 y 2000 pb (Fermentas®). Luego de la electroforesis, el gel se sometió a inmersión en bromuro de etidio (0,5 µg/mL) (Fermelo®) y las bandas fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminator UVP®), y fotografiadas.

f) Medidas de bioseguridad

El trabajo de laboratorio se realizó acorde a los niveles de bioseguridad establecidos para los laboratorios de microbiología y virología animal, como uso de material limpio, correcta eliminación de desechos y la utilización de delantal cerrado y guantes en el trabajo práctico. El proceso de visualización del producto amplificado involucró el uso de bromuro de etidio y un transiluminador de luz UV. Debido a esto, al momento de la visualización del gel se utilizó una placa de acrílico y gafas con filtro UV. Posteriormente la eliminación del gel sumergido en bromuro de etidio contempló su incineración, pues el compuesto químico mencionado tiene -entre otras- propiedades mutagénicas.

4.3. Determinación de la concentración viral mínima detectable por PCR convencional.

Para determinar la cantidad mínima de virus detectados por la prueba de PCR convencional para ambos fragmentos, se utilizaron 17 tubos Eppendorf del aislado RP5 con diluciones al décimo (10^{-1} y 10^{-17}) a partir de un inóculo con $DICT_{50} = 1.58 \times 10^6$ de RP5 (es decir, desde 79000 $DICT_{50}$ hasta 0.0000000000079 $DICT_{50}$).

4.4 Determinación del porcentaje de identidad nucleotídica respecto del GenBank®

a) Secuenciación. El fragmento de ADN amplificado de 450 pb se envió al centro de secuenciación de la empresa Genytec cumpliendo sus requerimientos. Las secuencias se

obtuvieron, utilizando el kit Big Dye Terminator, de Applied Biosystems. Para la lectura de estos fragmentos se utilizó el equipo ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (normativa de Genytec; Anexo 8).

Antes de realizar la secuenciación fue necesario efectuar un proceso de purificación al amplicón, usando el kit comercial “HiYield PCR DNA fragments extraction kit” (Bioscience®). Este proceso consistió en transferir 100 µL de la mezcla de reacción a un tubo de microcentrífuga, al que se agregaron cinco volúmenes de Buffer DF al tubo, y se homogenizó en el vórtex. En seguida, se aplicó la mezcla a una columna DF ensamblada en un tubo de plástico de 2 ml. Se centrifugó a 10.000xg durante un minuto a temperatura ambiente y se eliminó el líquido residual.

Luego se agregó 600 µL del buffer de lavado diluido en etanol absoluto y se centrifugó a 10.000xg durante un minuto a temperatura ambiente. Se eliminó el líquido residual y se volvió a colocar la columna en el tubo. Enseguida, se centrifugó la columna vacía durante dos minutos a temperatura ambiente. Se colocó en un tubo plástico de 1,5 ml y se agregó 30 µL de agua libre de nucleasas. Se incubó durante dos minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 10.000xg durante dos minutos para eluir el ADN. Este eluido se guardó a -20°C.

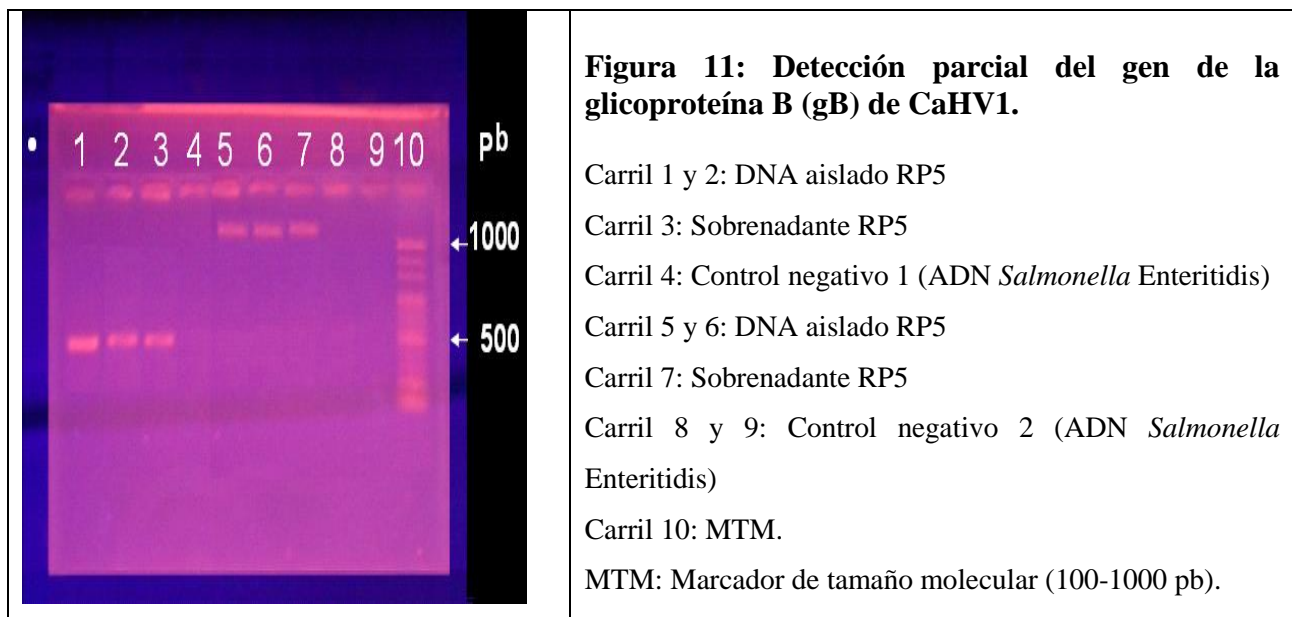
Finalmente el amplicón purificado se visualizó mediante un gel de agarosa al 2% y al utilizar un marcador de peso molecular se determinó que la concentración aproximada era alrededor de 50 ng/ µL .

b) Análisis. Las secuencias obtenidas se alinearon usando el programa Clustal W 2.0.12 de libre acceso (Thompson *et al.*; 1994) junto al gen de la proteína gB del CaHV1 (GenBank accession number AF361073; Reubel *et al.*, 2002) y se estableció el porcentaje de identidad nucleotídica. Adicionalmente la secuencia obtenida se alineó a otra secuencia del gen gB (GenBank accession number AY582737; Erles *et al.*, 2004) utilizando el mismo *software* mencionado.

5. RESULTADOS

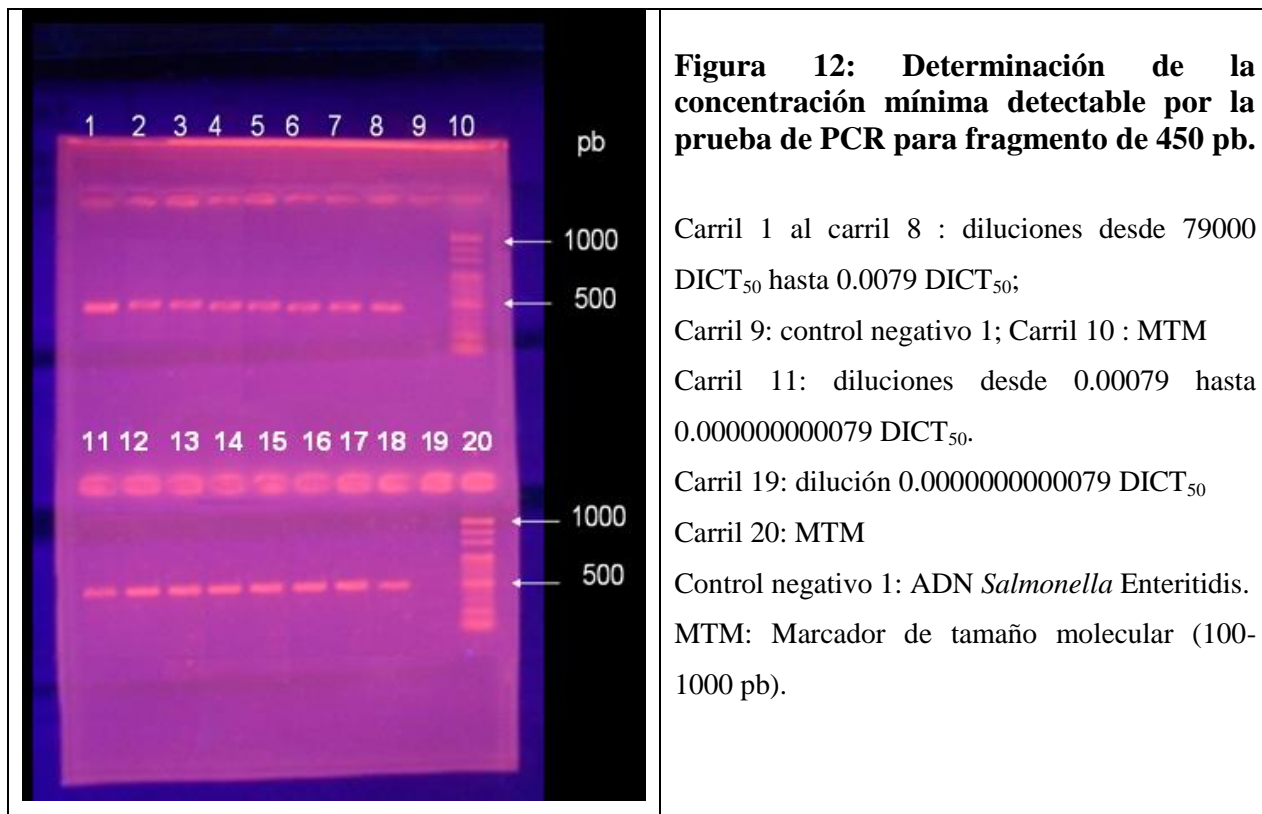
5.1. Detección parcial del gen de la glicoproteína B (gB) de CaHV1 mediante PCR.

Al realizar la técnica de PCR convencional de acuerdo a los protocolos descritos, para el fragmento mayor equivalente a 1286 pb y para el fragmento menor equivalente a 450 pb respectivamente, a partir del aislado viral RP5, se logró amplificar los fragmentos buscados del gen gB. Las bandas obtenidas se ubicaron entre los 1200 y 1300 pb y entre 400 y 500 pb respectivamente, las que se observaron gruesas y nítidas (Figura 11). Se obtuvo una sola banda por carril, lo que indica que no hubo amplificación inespecífica.



5.2. Determinación de la concentración viral mínima detectable por PCR convencional

Al realizar la prueba de PCR convencional en aislado RP5 con diluciones al décimo que fluctuaron entre 10^{-1} y 10^{-16} DICT₅₀ para cada uno de los fragmentos, se obtuvo bandas ubicadas entre los 1200 y 1300 pb hasta la dilución de 10^{-3} para el fragmento mayor y bandas ubicadas entre los 400 y 500 pb hasta la dilución de 10^{-16} (Figura 12).



5.3. Determinación del porcentaje de identidad nucleotídica respecto del GenBank®

Las secuencias entregadas por Genytec Ltda. mostraron una alto porcentaje de identidad nucleotídica entre sí, tanto las originadas por el partidor RP1 como las originada a partir del partidor RP2 (95%; Anexos 9 y 10). Con estas secuencias se obtuvo una hebra de consenso (LCM) (Anexo 11).

Amplificado de consenso (LCM)

```
AGCTTCGGATGATATTCGGGAAATTTAGGTGAATCCCAAATTGAATCTGATGATACAT
CAACATTTTACAGGGACCCACCACAATCGGGATCAACATTGGTGCCTTGGAGCCACCT
AGAGCATGTCCTAACTATAAACTTGGTAAAAATTTTACAGAAGGAATTGCTGTAATATT
TAAGGAAAATATTTCTCCTTATAAAATTTAAAGCTAATATATACTACAAAAATATTATTAT
CACCCTGTATGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAATTACTAATAGATATACAGATCGTG
TACCTATAGGTGTTCTGAAATTACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTATGTGTTTATCA
AAAGCTGATTATATTCGTAATAATTATGAATTTACCGCATTGATAAGGATGAAGACCC
CAGAGAAGTTCATTTAAAGCCCA
```

La secuencia de consenso fue alineada utilizando el programa Clustal W 2.1.12 *on line*, con dos secuencias del GenBank (*accession number* AF361073 y AY582737) del gen gB del virus herpes

canino. Este alineamiento entregó un porcentaje de identidad nucleotídica de un 97 % (Cuadro5; Anexos 12,13 y 14).

Cuadro 5: Porcentaje de identidad nucleotídica del amplicón LCM

Secuencia	pares de bases	% identidad nucleotídica
gB (GenBank accession number AF361073)	442	97
gB (GenBank accession number AY582737)	442	
Amplificado gB nacional (LCM)	437	

6. DISCUSIÓN

Desde hace medio siglo, en Estados Unidos de Norteamérica se ha descrito al virus herpes canino tipo 1 (CHV-1) como causante de una enfermedad hemorrágica mortal en cachorros menores de cuatro semanas (Carmichael *et al.*, 1965), cuadro que tiene un gran impacto tanto emocional para los dueños de mascotas, como económico para las empresas de venta de mascotas.

En adultos, si bien inicialmente la presencia de este virus se asoció a la causa de la traqueobronquitis infecciosa (TBI) o también llamada “tos de las perreras”, con el tiempo se comprobó que solo corresponde a un agente patógeno secundario. Sin embargo, la presentación de TBI puede ser un indicio de la presencia del CaHV1. En un plantel reproductor, lo más importante son los trastornos reproductivos y las lesiones genitales provocadas por CaHV1 (Dumon y Mimouni, 2005; Carter et al, 2006; Kawakami, 2010).

Los resultados obtenidos en esta Memoria de Título mediante el uso de la técnica de PCR permiten afirmar que el aislado RP5 corresponde a virus herpes canino tipo 1, esto nos permitirá considerarlo como cepa nacional, y en un futuro elaborar una vacuna con el fin de proteger la presentación de los distintos cuadros en los cánidos, ya sea como mascota o reproductor.

La técnica de PCR es utilizada ampliamente a nivel mundial, para la detección de zonas específicas de una gran variedad de agentes patógenos. La masificación de su uso se debe a sus ventajas: **rapidez**, en la obtención de los resultados en comparación a otras técnicas diagnósticas; **sensibilidad**, dada por la capacidad de amplificar secuencias desde una cantidad mínima de ADN inicial, incluso sólo desde una célula (Gibbs, 1990; Erlich *et al*, 1991; Arnheim y Erlich, 1992) y **especificidad**, dada por el uso de los partidores (Belák y Ballagi-Pordány, 1993).

Una primera consideración de la técnica del PCR está dada por su sensibilidad y al respecto una de las mayores precauciones es la aplicación de un método de extracción de ADN estandarizado, con el fin de obtener un ADN puro y no degradado. Así mismo, se debe evitar la contaminación de las muestras en estudio, contaminación dada por ADN externo presente en el ambiente (aerosoles) por lo cual el uso de guantes de látex durante el procedimiento se hace indispensable;

o por moléculas provenientes de experiencias anteriores, en que la importancia estará en el proceso de esterilización del material a usar y del gabinete en que se realiza la mezcla de reacción del PCR. Con esto, se logra la obtención de resultados confiables reflejado finalmente en la ausencia de bandas inespecíficas en el gel de agarosa (Dieffenbach y Dveksler, 1993; Torres y Baca, 1995; Mifflin, 2003).

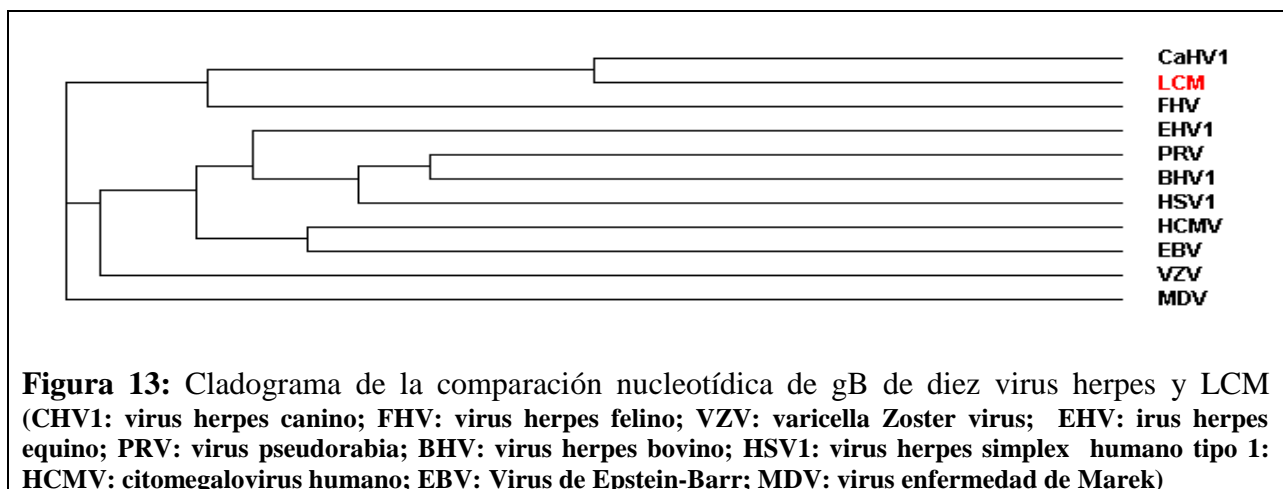
En esta Memoria de Título, todas las muestras de CaHV1 sometidas a PCR amplificaron fragmentos de tamaño esperado de 450 pb y 1286 pb, mientras que en las muestras de control negativo (*Salmonella* Enteritidis) sometidas al PCR no se detectó fragmento alguno. Lo anterior, aleja la posibilidad de un problema en la extracción de ADN, que podría haberse reflejado en la obtención de falsos negativos. Por otra parte, las muestras de *Salmonella* Enteritidis, al resultar negativas, alejan la posibilidad de obtención de falsos positivos. Adicionalmente, la obtención de bandas nítidas y únicas en el caso de las muestras positivas, da cuenta de una amplificación específica, producto además de haberse tomado todas las medidas pertinentes de manipulación y esterilidad en el laboratorio durante la realización de esta técnica

La técnica implementada en esta memoria de Título corresponde a un segundo intento de desarrollar un método diagnóstico de CaHV1 en los Laboratorios de Virología y Microbiología de esta Facultad. De esta forma, resulta inexcusable realizar una comparación entre las sensibilidades de ambos protocolos de PCR. Así, al conocer la concentración viral mínima detectable mediante diluciones al décimo de DICT₅₀ para ambos fragmentos, quedó demostrado que (1) la sensibilidad es mayor para el fragmento de 450 pb, observándose bandas de amplificación hasta la dilución 10^{-16} (que equivale a 0,000000000079 DICT₅₀), a diferencia del fragmento de 1286 pb que se observó bandas de amplificación hasta la dilución 10^{-3} (que equivale a 790 DICT₅₀) y (2) a medida que la concentración viral disminuía, se esperaba que tanto el grosor como la nitidez de las bandas se hicieran cada vez menores; pero hasta la dilución 10^{-16} se observaron bandas gruesas y nítidas lo que implica que este protocolo posee una mayor sensibilidad en comparación a la detección del gen de la proteína UL37, en que es posible detectar el fragmento amplificado solo hasta la dilución 10^{-8} (equivalente 0,0079 DICT₅₀) (Fuentes, 2010).

Lo anteriormente mencionado solo es válido si existe un respaldo que permita determinar si los fragmentos de ADN obtenidos corresponden ciertamente a las secuencias del gen gB almacenadas en el GenBank desde hace algunos años. Así, en cuanto a secuenciación nucleotídica, dentro de los virus ADN la mayor información disponible corresponde a la familia *Herpesviridae*, que actualmente cuenta con la secuenciación del genoma completo de 26 especies y otras con la secuenciación parcial de su genoma. Si bien hasta la fecha el genoma de CaHV1 se encuentra secuenciado parcialmente, la incorporación de secuencias de nucleótidos ha permitido complementar la taxonomía viral, generada originalmente por características biológicas (McGeoch y Cook, 1994; McGeoch *et al.*, 1995; Murphy *et al.*, 1999; Davison, 2002).

Actualmente, se estima que las subfamilias del orden *Herpesvirales* se originaron de un ancestro que ha contribuido con 43 genes, los que tienden a localizarse en la región central del genoma, conocidos como genes conservados. Sin embargo, el orden y la orientación de estos genes no es la misma entre las subfamilias (McGeoch y Davison, 1999; Pellett y Roizman, 2007). El gen gB forma parte de estos genes conservados y es considerado esencial ya que resulta imprescindible para la proliferación efectiva del virus en cultivos celulares (McGeoch y Cook, 1994; Pellett y Roizman, 2007).

La función del gen gB es importante, de ahí que evolutivamente se ha mantenido y forma parte de los genes conservados en el genoma de virus herpes; ésto queda mostrado en un cladograma mediante la comparación nucleotídica del gen gB de diez virus herpes (Figura 13, Anexo 2).



En la figura 13 se ha incorporado el amplificado obtenido en esta Memoria de Título (LCM) y de acuerdo al cladograma presentaría un alto porcentaje de identidad nucleotídica con CaHV1.

Para determinar el porcentaje de identidad nucleotídica existente entre el amplificado LCM y el gen gB descrito y almacenado en el GenBank, el fragmento de 450 pb obtenido y secuenciado en esta Memoria de Título fue alineado mediante el programa Clustal W2 con dos secuencias nucleotídicas oficiales: accession numbers AF361073 y AY582737, obteniéndose un 97% de identidad nucleotídica. Este resultado permite confirmar que el amplificado nacional LCM corresponde a un fragmento del gen de la glicoproteína B de CaHV1 y adicionalmente permiten complementar la caracterización molecular de CaHV1, iniciada con el estudio del gen UL37 (Fuentes, 2010) y paralelamente con el estudio del gen de la Timidina Kinasa (Memoria de Título en ejecución). A su vez, demuestran que el protocolo de PCR para esta técnica diagnóstica supera al del gen UL37, básicamente debido a que posee una sensibilidad mayor.

Lo anteriormente señalado toma mayor interés al considerar que dada la importancia de las patologías provocadas por CaHV1 en mascotas, a nivel internacional existen laboratorios que han incluido en sus servicios este diagnóstico viral mediante la técnica de PCR. Así, incluso se han creado kits diagnósticos para ser usados en clínicas veterinarias que cuenten con la infraestructura necesaria para ejecutar la técnica. Con esto se pretende realizar un diagnóstico en el menor tiempo posible para tomar las medidas necesarias para evitar la muerte de cachorros y la diseminación del virus en un plantel reproductor debido a un diagnóstico tardío (IDEXX, 2007; Genekam, 2007; Laboratorio D'Analisi Veterinarie San Marco, 2008).

Finalmente, actualmente en Chile no existe una técnica diagnóstica para CaHV1 basada en herramientas de biología molecular, existiendo solo la virología clásica que involucra el aislamiento viral y algunas técnicas serológicas. Cabe hacer notar que la única aproximación a una técnica diagnóstica molecular se realizó el año 2010 mediante una Memoria de Título paralela a ésta, en que mediante PCR convencional se detectó el gen de la proteína UL37 del CaHV1. En términos de sensibilidad, el protocolo de PCR de este trabajo superaría con creces al mencionado precedentemente (Fuentes, 2010).

7. CONCLUSIONES

1. El porcentaje de identidad nucleotídica de un 97% permite asegurar que el aislado RP5 corresponde a virus herpes canino tipo 1 y complementa la caracterización molecular iniciada con el gen de UL37.
2. La concentración viral mínima detectable por la técnica de PCR convencional para los fragmentos de glicoproteína B fueron: 790 DICT₅₀ para el fragmento mayor y 0.000000000079 DICT₅₀ para el fragmento menor. Esto representa una sensibilidad mayor que la técnica que detecta el gen de la UL37.
3. Dada la sensibilidad y especificidad de la detección del gen de la glicoproteína B obtenida en este trabajo, se puede sugerir su uso como técnica diagnóstica de CaHV1 en Chile.

8. ANEXOS

ANEXO 1: Algunos desinfectantes antivirales comúnmente disponibles comercialmente

DESINFECTANTE	EJEMPLOS	USOS	COMENTARIOS
Alcohol	Etil, isopropil	Manos, termómetros	Viricidina moderado a 70-80%. El etanol es preferible.
Chlorhexidina	Hibitane, Nolvasan	Muchos usos, incluyendo mesas de examinación, jaulas y otras superficies	Tolerante a la presencia de compuestos orgánicos, fluidos corporales, etc. Elevado costo.
Detergentes iodóforos	Betadine, Wescadine, Redene	Agua de bebida, alimentos, y utensilios, lecherías y desinfección de superficies pequeñas	Acción basada en liberación de yodo y detergente. Menos afectado por proteínas elevadas. Elevado costo.
Dióxido de etileno		Para materiales sensibles al calor	Disponible como gas comprimido al 10% con 90% de CO ₂ , de otra manera es tóxico y explosivo.
Formaldehído	Formalina	Superficies de lavandería y camas; en forma de vapor para otras superficies	Bajo poder de penetración. Produce irritación hipersensible.
Glutaraldehído	Cidex	Esterilización fría de instrumentos con lentes	Solución buffer al 2% con bicarbonato de sodio; viricida (10 min., pH 7.5-8.5). Elevado costo.
Derivados del fenol	Lysol, Dettol, Staphene, Sudol	Manos, mesas de examinación, jaulas y otras superficies	Solución acuosa al 2.5%. Su eficacia depende de la concentración y temperatura. Elevada concentración de proteínas disminuyen su eficacia.
Compuestos de amonio cuaternarios	Zephiran, Roccal, Savlon	Zephiran (cloruro de benzalconio) empleado para limpiar heridas	No es eficaz contra muchos virus. Elevada concentración de proteínas disminuyen su eficacia.
Hipoclorito de sodio	Chlorox, Chlorize	Igual que los detergentes iodóforos	Alta eficacia, acción rápida. Proteínas elevadas disminuyen su eficacia. Irritante. Bajo costo.

ANEXO 2: alineamiento de 10 secuencias descritas para el gen gB de distintas especies.

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

PRV	-CCCCCGGCCCTCGGAGG--CCCCGACGGCGAGTACGGC---GACCTGG-ACG--C--	49
BHV1	-GCCCCGACGGCGACGACG--CCGCCAGCCCCGACAACAGCACAGACGTG---CG--C--	50
HSV1	CGCCCCGCCGGCGACAACG--CGACCGTGCCTGGGGCCAGCCACCCTGC-GCGAGC--	55
EHV1	TGGGACAGTAGACCCTACG--CTGCTCCCCACAGAAACGCC--CGACCCAC-TCAGACTG	55
CaHV1	-----CAACAC--CTAAACCTACTTCGGAT-----GATATTC-GTGAAATT	38
LCM	-----AGCTTCGGAT-----GATATTC-GGGAATT	25
FHV	-----CAA--CTACAGATCCCACCGATATGTCCGGATATGA-GGGAACCT	41
MDV	-----TACGAACTCAT--CTCCGAGTACCCAAAATGT----GACATCAAGAGAAGTT	46
VZV	-----CTGCTCAT--CT--GGCGATGGTGAT-----GAAATCA-GAGAAGCT	38
HCMV	GAAGCCGTCAGTCATAGAG--CCAACGAGACTATCTACAACACTACCCTCAAGTATGGAG	58
EBV	-GCGTAGGCCTGGAACCGGTCCCTGGCTGCCTGCAAT-----GCTCTGCTGGCCACT-	52
PRV	GCCG-ACGG----CCGTGCGCGCGGCCGCG-ACCGAGCGGGAC---CGCTTCTACGTCTG	100
BHV1	GCCG--CGC----TCCGGCTCGCGCAGGCG-GCCGGGGAAAACTCGCGCTTCTTCGTGTG	103
HSV1	ACCT-GCGGGACATCAAG---GCGGAGAAC-ACCGATGCAAAC-----TTTTACGTGTG	104
EHV1	GCTGTGCGCGA-GTCCGGT--ATACTCGCT-GAGGATGGAGAC-----TTTTACACCTG	105
CaHV1	-TTACGTGAA---TCCCA-----AATTGAA-TCTGATGATACATCAACATTTTACATGTG	88
LCM	-TTAGGTGAA---TCCCA-----AATTGAA-TCTGATGATACATCAACATTTTACAGGGA	75
FHV	-CTCCGTGCG---TCCCA-----AATAGAG-GCTAACGGACCATCGACTTTTTATATGTG	91
MDV	GTTTCGAGCG---TCC-----AGTTG---TCTGAGGAAGAGTCTACGTTTTATCTTTG	93
VZV	-ATACACAAG---TCCCA-----GGACG---CCGAAACAAAACCCACGTTTTACGTCTG	85
HCMV	ATGTGGTGGG-----GGTCAAC-ACCACCAAGTACCC---CTATCGCGTGTG	101
EBV	-----GAGGG---TCC-----GGCCGCCCTCTGAGCTGCTCTC----TTTTGCTCCTG	93
PRV	C-CCGCCGCCGTCC-GGCTCCACGGTGGTGC GGCTGGAGC----CCGAGCAGGC-----	148
BHV1	C-CCGCCGCCCTCG-GGCGCCACGGTGGTCCGGCTCGCGC---CCGCGCGGCC-----	151
HSV1	C-CCACCCCCACG-GGCGCCACGGTGGTGCAGTTCGAGCA--GCCGCGCCGC-----	153
EHV1	C-CCACCCCTACC-GGATCCACCGTACGCATCGAACC--ACCTAG--AAC-----	153
CaHV1	C-CCACCACCATCG-GGATCAACATTGGTGC GTTTTGGAGCC--ACCTAG--AGC-----	136
LCM	C-CCACCACAATCG-GGATCAACATTGGTGC GTTTTGGAGCC--ACCTAG--AGC-----	123
FHV	T-CCACCACCTTCA-GGATCTACTGTGCTGC GTTTTAGAGCC--ACCACG--GGC-----	139
MDV	T-CCCCACCAGTG-GGTTCAACCGTGATCCGCTTAGAACC--GCCGCG--AAA-----	141
VZV	C-CCACCGCCAACA-GGCTCCACAATCGTACGATTAGAACC--AACTCG--GAC-----	133
HCMV	TTCCATGGCCCA-G-GGTACGGATCTTATTCGTTTTGAACGTAATATCGT--CT-----	151
EBV	G--TTTTGCTCATGCAGCGCTAACATGATG-GCTTGTAAATCTGTCTTACTAATGGGATT	150
PRV	-CTGCCCCGAGTACTCGCAGGGG-CGCAACTTACGGAGGGGA-TCGCCGTGCTCTTCAA	205
BHV1	-GTGCCCTGAGTACGGGCTCGGG-CGGAACTACACGGAGGGCA-TCGGCGTCATTTACAA	208
HSV1	--TGCCC-GACCCGGCCGAGGGTCAGAACTACACGGAGGGGA-TCGCGGTGGTCTTCAA	209
EHV1	-TTGCCCAAGTTTGACCTTGGG-AGAAACTTACGGAGGGGA-TTGCTGTTATTTTTAA	210
CaHV1	-ATGTCCTAACTATAAACTTGGT-AAAAATTTTACAGAAGGAA-TTGCTGTAATATTTAA	193
LCM	-ATGTCCTAACTATAAACTTGGT-AAAAATTTTACAGAAGGAA-TTGCTGTAATATTTAA	180
FHV	-CTGTCCAGATTATAAACTAGGG-AAAAATTTTACCGAGGGTA-TAGCTGTAATATTTAA	196
MDV	-ATGTCCCGAACCTAGAAAAGCC-ACCGAGTGGGGTGAAGGAA-TCGCGATATTTATTTAA	198
VZV	-ATGTCCGGATTATCACCTTGGT-AAAAATTTTACAGAGGGTA-TTGCTGTTGTTTTATA	190
HCMV	-GCACCCCGATGAAGCCCATCAATGAAGACCTTGGACGAGGGGA-TCATGGTGGTCTACAA	209
EBV	AATGCCGTGACCCCTACCAGAGG----CATGTTGCTGAGCGAGCTCGTCG--ATCCCGGG	204

PRV GGAGAACATC-GCCCCG-----CACAA-GTTCAAGGCCACATCTACTACAAGA-----A 253
 BHV1 GGAGAACATC-GCGCCG-----TACAC-GTTCAAGGCCACATTT---ACAAAA-----A 253
 HSV1 GGAGAACATC-GCCCCG-----TACAA-GTTCAAGGCCACCATGTACTACAAG-----A 257
 EHV1 GGAAAACATC-GCTCCC-----TACAA-ATTCAGGGCAAACGTATACTACAAG-----A 258
 CaHV1 GGAAAATATT-TCTCCT-----TATAA-ATTTAAAGCTAATATATACTACA AAA-----A 241
 LCM GGAAAATATT-TCTCCT-----TATAA-ATTTAAAGCTAATATATACTACA AAA-----A 228
 FHV AGAAAATATA-GCGCCA-----TATAA-ATTC AAGGCAAATATATACTATAAAA-----A 244
 MDV AGAGAATATC-AGTCCA-----TATAA-ATTTAAAGTGACGCTTTATTATAAAA-----A 246
 VZV AGAAAACATT-GCAGCG-----TACAA-GTTTAAGGCGACGGTATATTACAAG-----A 238
 HCMV ACGCAACATC-GTCGCG-----CACAC-C'TTTAAGGTACGGGTC'TACCAGAAGGTTTTGA 262
 EBV GTAGAGCATCTGCACCGGCTGCTGCGACATCTGGCGCGTGC GCCT--CGTGAGG----GA 258

* * * * * * * * *

PRV CGT--CATCGTCACGACCGTGTGGTCCGGGAGCACGTACGCGGCCA--TCACGAACCGCT 309
 BHV1 CGT--GATCGTGACCACGACCTGGGCGGGCAGCACGTACGCGGCCA--TTACAAACCAGT 309
 HSV1 CGT--CACCGTTTCGCAGGTGTGGTTCGGCCACCGCTACTC--CCAGTTTATGGGGATCT 313
 EHV1 CAT--CGTTGTAACACGTGTGTGGAAAGGATACAGCCATACGTCCC--TGTCCGACAGAT 314
 CaHV1 TAT--TATTATCACCACCTGTATGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAA--TTACTAATAGAT 297
 LCM TAT--TATTATCACCACCTGTATGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAA--TTACTAATAGAT 284
 FHV CAT--TATTATGACAACGGTATGGTCTGGGAGTTCCATGCCGTTA--CAACCAACCGAT 300
 MDV TAT--CATTCAGACGACGACATGGACGGGGACGACATATAGACAGA--TCACTAATCGAT 302
 VZV TGT--TATCGTTAGCACGGCGTGGGCCGGAAGTTCTTATACGCAA--TTACTAATAGAT 294
 HCMV CGTTTCGTCGTAGCTAC-GCTTACATCCACACCCTTATCTGCTGG-----GCAGCA 313
 EBV AAT--AACCAGGATCACCACCCCGCCACCAGGACCAGAATGAGCA---TGC----- 305

*

PRV TCACAGACCGCGTGCCCCGTCCCCGTGCAGGAGATCACGGACGTGATCGACC-GCCGCGGC 368
 BHV1 ACACGGACCGCGTGCCCCGTGGGCATGGGCGAGATCACGGACCTGGTGGACAAGAAGTGGC 369
 HSV1 TTGAGGACCGCGCCCCCGTCCCC'TTCGAGGAGGTGATCGACAAGATCAACGCCAAGGGG- 372
 EHV1 ACAATGACAGGGTTCGGTTCGGTGGAGGAGATCTTCGGTCTCATCGACAGTAAGGGA- 373
 CaHV1 ATACAGATCGTGTACCTATAGGTGTTCC'TGAAATTACAGAGTTGATTGATA-GAAGAGGT 356
 LCM ATACAGATCGTGTACCTATAGGTGTTCC'TGAAATTACAGAGTTGATTGATA-GAAGAGGT 343
 FHV ATACAGACAGGGTTC'CCCGTGAAGTTCAAGAGATTACAGATCTCATAGATA-GACGGGGT 359
 MDV ATACAGATAGGACGCCCGTTTCCATTGAAGAGATCACGGATCTAATCGACG-GCAAAGGA 361
 VZV ATGCGGATAGGGTACCAATTCCCGTTTTCAGAGATCACGGACACCATTGATA-AGTTTGGC 353
 HCMV ACACGGAATACGTGGCGCCTCCTATGTGGGAGATTCT--ATCATATCAACA-GGCACAGT 369
 EBV -CGCCGAAGGGTTTTTTGAAGAAGGAGATGAAACCAGAGACCAGGCTGCTA-----AAC 358

**

**

PRV AAGTGCG----TCTCCAAGGCCGAGTACGTGCGCAACAACCACAAG-GTGACCGCCTTCG 423
 BHV1 GC-TGCC----TTTCGAAAGCCGAGTACCTGCGCAGCGGGCGCAAG-GTGGTGGCCTTTG 423
 HSV1 GTCTGTC----GGTCCACGGCCAAGTACGTGCGCAACAACCTGGAG-ACCACCGCGTTTC 427
 EHV1 AAATGTT----CGTCAAAGGCCGAGTACCTCAGAGATAACATCATGCACCAC-GCGTACC 428
 CaHV1 ATGTGTT----TATCAAAAGCTGATTATATTCGTAATAATTATGAA-TTTACCGCATTTG 411
 LCM ATGTGTT----TATCAAAAGCTGATTATATTCGTAATAATTATGAA-TTTACCGCATTTG 398
 FHV ATGTGCC----TCTCGAAAGCTGATTACGTTTCGTAACAATTATCAA-TTTACGGCCTTTG 414
 MDV AGATGCT----CATCTAA-GCAAGATACCTTAGAAACATGTATATG-TTGA-AGCGTTTG 414
 VZV AAGTGTT----CTTCTAAAGCAACGTACGTACGAAATAACCACAAA-GTTGAAGCCTTTA 408
 HCMV CAGTGCTACAGTTCTTACAGCCGCGT-----TATAGCAGGCACGGTTTTTCGTGGCGTATC 424
 EBV AAACCCC----CCACCGT-GCTGACTAGGTTGGTGATGGAC-TGACCCACGCTACCCAGA 412

**

*

*


```

PRV      ACCGCGACGAGAACCCCGTCGAGG---TGGACCTGCGCC-CCTCG--- 464
BHV1     ACCGCGACGACGACCCCTGGGAGG---CGCCGCTGAAGC-CTGCG--- 464
HSV1     ACCGGGACGACCACGAGACCCGACA---TGGAGCTGAAAC-CGGCCAA- 470
EHV1     ACGACGACGAGGACGAGGTGGAGC---TTGATTTGGTGC-CGTCCAA- 471
CaHV1    ATAAGGATGAAGACCCAGAGAAG---TTCATTTAAAGC-CTTCA--- 452
LCM      ATAAGGATGAAGACCCAGAGAAG---TTCATTTAAAGC-C--CA--- 437
FHV      ATCGAGACGAGGATCCCAGAGAAC---TGCCTCTGAAAC-CCTCC--- 455
MDV      ACAGGGATGCGGGGAGAAAAACAAG---TACTTCTAAAAC-CATCA--- 455
VZV      ATGAGGATAAAAAATCCACAGGATA---TGCCTCTAATCG-CATCA--- 449
HCMV     ATAGGGACAGCTATGAAAACAAAACCATGCAATTAATGCTCGACGAT- 471
EBV      CTGTCCATAAGTTCCCCAGGCCGTCCACGAATTGATTT-CTTCCGTT 459

```

* * * *

b) Porcentajes de identidad nucleotídica:

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	CaHV1	452	2	LCM	437	97.0
1	CaHV1	452	3	FHV	455	73.0
1	CaHV1	452	4	EHV1	471	59.0
1	CaHV1	452	5	PRV	464	53.0
1	CaHV1	452	6	BHV1	464	50.0
1	CaHV1	452	7	VZV	449	64.0
1	CaHV1	452	8	MDV	455	62.0
1	CaHV1	452	9	HSV1	470	51.0
1	CaHV1	452	10	HCMV	471	47.0
1	CaHV1	452	11	EBV	459	43.0
2	LCM	437	3	FHV	455	74.0
2	LCM	437	4	EHV1	471	58.0
2	LCM	437	5	PRV	464	53.0
2	LCM	437	6	BHV1	464	52.0
2	LCM	437	7	VZV	449	64.0
2	LCM	437	8	MDV	455	62.0
2	LCM	437	9	HSV1	470	52.0
2	LCM	437	10	HCMV	471	47.0
2	LCM	437	11	EBV	459	41.0

FHV-1: Virus Herpes Felino; EHV-1: Virus Herpes Equino; PRV: Virus de la Pseudorrabia; BHV-1: Virus Herpes Bovino; VZV: Virus Varicela-Zoster; MDV: Virus Herpes de la enfermedad de Marek; HSV-1: Virus Herpes Simplex; HCMV: Citomegalovirus; EBV: Virus de Epstein-Barr.

ANEXO 3: Contenido del kit “Genomic DNA purification” (Fermentas®)

Compuesto	Cantidad
Solución de lisis	400 ml
Solución de precipitación	8 ml
Solución de NaCl	10 ml

ANEXO 4: Reconstitución de los partidores para la detección de CaHV-1

Todos los partidores (liofilizados) fueron resuspendidos en agua libre de nucleasas (10 veces el volumen con respecto de la cantidad del partidor en nmoles), logrando así una concentración final de 0.1 nmoles/ μ L (solución stock; congeladas a -20°C). La solución de trabajo se obtuvo de tomar 10 μ L de la solución stock de cada partidor y mezclarlo con 990 μ L de agua libre de nucleasas, por lo cual la concentración de cada partidor a utilizar en la reacción de PCR fue de 0,001 nmoles/ μ L. Sin embargo, al considerar que en cada reacción se agregaron 5 μ L (0,005 nmoles) y que el volumen final de reacción de PCR es 30 μ L, la concentración final de cada partidor es 0,00017 nmoles/ μ L.

Concentraciones de cada partidor

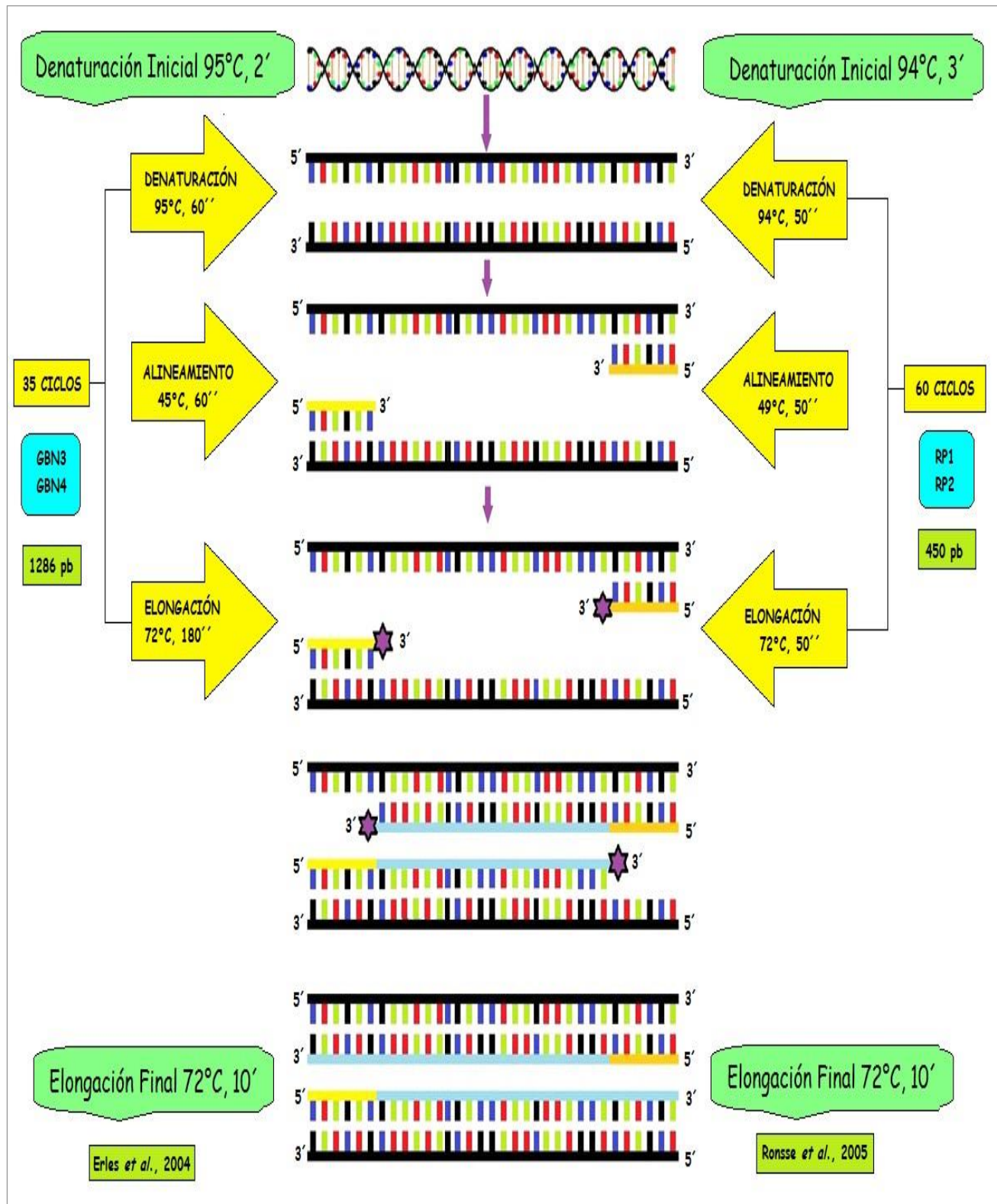
Partidor	nmoles	nmoles/ μ L	nmoles/ μ L en mezcla PCR
GBN3	39,2	0,1	0,00017
GBN4	41,5	0,1	0,00017
RP1	49,9	0,1	0,00017
RP2	27,8	0,1	0,00017

ANEXO 5: Contenido del kit “2X PCR Master Mix” (Fermentas®).

Compuesto	Cantidad
ADN <i>Taq</i> Polimerasa (recombinante)	0,05 U/ μ L
Buffer de reacción	
MgCl ₂	4 mM
Dexosinucleótido tri-fosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,4 mM de cada uno

Se utilizaron 15 μ L de esta mezcla por reacción.

ANEXO 6: Protocolo de amplificación de ambos fragmentos del gen de la glicoproteína B



ANEXO 7:

Contenido de “6X Mass Ruler Loading Dye Solution” (Fermentas®)

Compuesto	Cantidad
Tris - HCl (pH 7.6)	10 mM
EDTA	60 mM
Azul de Bromofenol	0,03%
Glicerol	60%

ANEXO 8:

Protocolo del Laboratorio GENYTEC para el envío de amplicones para secuenciación

El protocolo a seguir para determinar la cantidad de ADN a enviar es el siguiente:

Para productos de PCR: Tamaño del fragmento x 0.1 = ng de ADN para una reacción de secuencia. (Ej: un amplicón de 500 pb calcular $500 \times 0.1 = 50$ ng por reacción necesarios. El volumen máximo de reacción de secuencia es de 10 ul por lo cual la mínima concentración de este producto es de 5 ng/uL. Se enviaron 5 uL de amplificado purificado con una concentración de 50 ng/uL. Adicionalmente se enviaron 10 uL del partidor a una concentración 10 uM (Fuente Genytec).

Características de la Muestra Enviada a Secuenciar (Protocolo Laboratorio Genytec)				
Código	Tamaño (pb)	Concentración (ng/ul)	Volumen (ul)	Partidor a usar
G1	450	50	4	P3-P4
G2	450	50	4	P3-P4
G4	450	50	4	P3-P4

ANEXO 9.

De GENYTEC Ltda. se recibieron las siguientes secuencias (G13; G23; G43) en relación al partidador RP1:

>1.G13

AGCTTCGGATGATATTCGGGAGGTTTTAGGTAAATCCCAAATTGAATCTGATGACCCAT
AACAGGGGGGGGGGGGAAACAAAAATCGGGATCAACATTGGTGCCTTTGGAGCGACCT
AGAGCATGTCCTAACTATAAACTTGGTAAAAATTTACAGAAGGAATTGCTGTAATATT
TAAGGAAAATATTTCTCCTTATAAAATTTAAAGCTAATATATACTACAAAAATATTATTAT
CACCCTGTATGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAATTAATAATAGATATACAGATCGTG
TACCTATAGGTGTTCTGAAATTACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTATGTGTTTATCA
AAAGCTGATTATATTCGTAATAATTATGAATTTACCGCATTTCGAAAAGGACGAAGACCC
CCGAGAAGTTCATTTAAAGCCC

>2.G23

AGCTTCGGATGATATTTGGGAGGTTTTAGGTGAATCCCAAATTGAATCTGATGATACAT
AACATTCACAGGTGCCACCACAATCGGGATCAACATTGGTGCCTTTGGAGCCACCTAG
AGCATGTCCTAACTATAAACTTGGTAAAAATTTACAGAAGGAATTGCTGTAATATTTAA
GGAAAATATTTCTCCTTATAAAATTTAAAGCTAATATATACTACAAAAATATTATTATCAC
CACTGTATGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAATTAATAATAGATATACAGATCGTGTAC
CTATAGGTGTTCTGAAATTACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTATGTGTTTATCAAAA
GCTGATTATATTCGTAATAATTATGAATTTACCGCATTTGATAAGGATGAAGACCCCAG
AGAAGTTCATTTAAAGCCCA

>3.G43

AACTTCGGATGATATTCGGGAAATTTTAGGAAAATCCCAAATTGAATCTGATGATCCA
TAACAGCCCCGGGGGAACACAAAAATCGGGATCAACATTGGTGCCTTTGGAGCCACCT
AGAGCATGTCCTAACTATAAACTTGGTAAAAATTTAACAGAAGGAATTGCTGTAATATT
TAAGGAAAATATTTCTCCTTATAAAATTTAAAGCTAATATATACTACAAAAATATTATTAT
CACCCTGTATGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAATTAATAATAGATATACAGATCGTG
TACCTATAGGTGTTCTGAAATTACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTATGTGTTTATCA
AAAGCTGATTATATTCGTAATAATTATGAATTTACCGCATTTCGATAAGGATGAAGACCC
CCAGAGAAGTTCATTTAAAGCCCA

ANEXO 10:

De GENYTEC Ltda. se recibieron las siguientes secuencias (G14; G24; G44) en relación al partidador RP2:

>4.G14

GATGATTTTCGTGAGATTTTACGTGAATCCCAAATTGAATCTGATGATACATCAACATTT
TACATGTGCCACCACCATCGGGATCAACATTGGTGCGTTTGGAGCCACCTAGAGCATG
TCCTAACTATAAACTTGGTAAAAATTTTACAGAAGGAATTGCTGTAATATTTAAGGAAA
ATATTTCTCCTTATAAATTTAAAGCTAATATATACTACAAAAATATTATTATCACCCTG
TATGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAATTATTAATAGATATACAGATCGTGTACCTATA
GGTGTTCCTGAAATTACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTATTTTTATCACAGCCGCGTT
ATTTCGAATGTATTTTGAATTTTTGCATTTGATAAGGATGAAGACCCCCGAGAAGTGT
TTTCTAAAGCCCA

>5.G24

TGATATTCGTGAAATTTTACGTGAATCCCAAATTGAATCTGATGATACATCAACATTTTA
CATGTGCCACCACCATCGGGATCAACATTGGTGCGTTTGGAGCCACCTAGAGCATGTC
CTAACTATAAACTTGGTAAAAATTTTACAGAAGGAATTGCTGTAATATTTAAGGAAAAT
ATTTCTCCTTATAAATTTAAAGCTAATATATACTACAAAAATATTATTATCACCCTGTA
TGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAATTATTAATAGATATACAGATCGTGTACCTATAGG
TGTTCTGAAATTACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTATGTTTTTATCCAAAGCCGCTA
TATTTTCGTGATAATTTTGAATTTCCCGCATTTGATAAGGATGAAGACCCCCGAGAAGTT
TTTTTTAAAGCCCA

>6.G44

TGATATTCGTGAAATTTTACGTGAATCCCAAATTGAATCTGATGATACATCAACATTTTA
CATGTGCCACCACCATCGGGATCAACATTGGTGCGTTTGGAGCCACCTAGAGCATGTC
CTAACTATAAACTTGGTAAAAATTTTACAGAAGGAATTGCTGTAATATTTAAGGAAAAT
ATTTCTCCTTATAAATTTAAAGCTAATATATACTACAAAAATATTATTATCACCCTGTA
TGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAATTTTTAATAGATATACAGATCGTGTACCTATAGG
TGTTCTGAAATTACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTTTTTGTTTTCTCAGCCGGGCTA
ATTCGTGATGAATTTGAATTTCCCGCATTTGATAAGGATGAAGACCCCCGAGAAGTTTT
TTTTAAAGCCCA

Alineamiento e identidad nucleotídica de las secuencias generadas por RP2:

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

G24      --TGATATTCGTGAAATTTTACGTGAATCCCAAATTGAATCTGATGATACATCAACATTT  58
G44      --TGATATTCGTGAAATTTTACGTGAATCCCAAATTGAATCTGATGATACATCAACATTT  58
G14      GATGATTTTTCGTGAGATTTTACGTGAATCCCAAATTGAATCTGATGATACATCAACATTT  60
          ****  *****

G24      TACATGTGCCACCACCATCGGGATCAACATTGGTGCGTTTGGAGCCACCTAGAGCATGT  118
G44      TACATGTGCCACCACCATCGGGATCAACATTGGTGCGTTTGGAGCCACCTAGAGCATGT  118
G14      TACATGTGCCACCACCATCGGGATCAACATTGGTGCGTTTGGAGCCACCTAGAGCATGT  120
          *****

G24      CCTAACATAAACTTGGTAAAAATTTTACAGAAGGAATTGCTGTAATATTTAAGGAAAAT  178
G44      CCTAACATAAACTTGGTAAAAATTTTACAGAAGGAATTGCTGTAATATTTAAGGAAAAT  178
G14      CCTAACATAAACTTGGTAAAAATTTTACAGAAGGAATTGCTGTAATATTTAAGGAAAAT  180
          *****

G24      ATTTCTCCTTATAAATTTAAAGCTAATATATACTACAAAAATATTATTATCACCACCTGTA  238
G44      ATTTCTCCTTATAAATTTAAAGCTAATATATACTACAAAAATATTATTATCACCACCTGTA  238
G14      ATTTCTCCTTATAAATTTAAAGCTAATATATACTACAAAAATATTATTATCACCACCTGTA  240
          *****

G24      TGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAATTTAATAGATATACAGATCGTGTACCTATAGGT  298
G44      TGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAATTTTAAATAGATATACAGATCGTGTACCTATAGGT  298
G14      TGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAATTTAATAGATATACAGATCGTGTACCTATAGGT  300
          *****

G24      GTTCCTGAAATTACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTATGTTTTTATCCAAAGCCGCTATA  358
G44      GTTCCTGAAATTACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTTTTTTGTTCCTCA--GCCGGGCTA  356
G14      GTTCCTGAAATTACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTAT---TTTTATCACAGCCGCTTA  357
          ***** *   **   *   **   *

G24      TTTTCGTGATA-ATTTTGAATTTCCCGCATTGATAAGGATGAAGACCCCGGAGAAGTTTT  417
G44      ATTCGTGATG-AATTTGAATTTCCCGCATTGATAAGGATGAAGACCCCGGAGAAGTTTT  415
G14      TTTTCG-AATGTATTTTGAATTTTTTGCATTTGATAAGGATGAAGACCCCGGAGAAGTGT  416
          ****  *  *  *****

G24      TTTTAAAGCCCA 429
G44      TTTTAAAGCCCA 427
G14      TTCTAAAGCCCA 428
          ** *****

```

Porcentaje de identidad nucleotídica:

seqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	4.G14	428	2	5.G25	429	96.0
1	4.G14	428	3	6.G44	427	95.0
2	5.G24	427	3	6.G44	427	96.0

ANEXO 11

Obtención de la secuencia de consenso (LCM) a partir del alineamiento de las seis secuencias entregadas por Genytec Ltda.

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```
G14      -----GATGATTTTCGTGAGATTTTACGTGAATCCCAAATTGAATCTGATGATACAT  52
G44      -----TGATATTCGTGAAATTTTACGTGAATCCCAAATTGAATCTGATGATACAT  50
G24      -----TGATATTCGTGAAATTTTACGTGAATCCCAAATTGAATCTGATGATACAT  50
G23      -AGCTTCGGATGATATTCGGGAGGTTTTAGGTGAATCCCAAATTGAATCTGATGATACAT  59
G13      -AGCTTCGGATGATATTCGGGAGGTTTTAGGTAAATCCCAAATTGAATCTGATGACCCAT  59
G43      AAAC TTCGGATGATATTCGGGAAATTTTAGGAAAATCCCAAATTGAATCTGATGATCCAT  60
          **** * * * * * **** * *****

G14      CAACATTTTACATGTGCCACCACCATCGGGATCAACATTTGGTGCGTTTGGAGCCACCTA  112
G44      CAACATTTTACATGTGCCACCACCATCGGGATCAACATTTGGTGCGTTTGGAGCCACCTA  110
G24      CAACATTTTACATGTGCCACCACCATCGGGATCAACATTTGGTGCGTTTGGAGCCACCTA  110
G23      -AACATTC-ACAGGTGCCACCACAATCGGGATCAACATTTGGTGCGTTTGGAGCCACCTA  117
G13      -AACAGGGGGGGGGGAAACAAAAATCGGGATCAACATTTGGTGCGTTTGGAGCGACCTA  118
G43      -AACAGCCCCGGGGGA-ACACAAAAATCGGGATCAACATTTGGTGCGTTTGGAGCCACCTA  118
          ****          *      ** * *****

G14      GAGCATGTCCTAAC TATAAACTTGGTAAAAATTTTACAGAAGGAATTGCTGTAATATTTA  172
G44      GAGCATGTCCTAAC TATAAACTTGGTAAAAATTTTACAGAAGGAATTGCTGTAATATTTA  170
G24      GAGCATGTCCTAAC TATAAACTTGGTAAAAATTTTACAGAAGGAATTGCTGTAATATTTA  170
G23      GAGCATGTCCTAAC TATAAACTTGGTAAAAATTTTACAGAAGGAATTGCTGTAATATTTA  177
G13      GAGCATGTCCTAAC TATAAACTTGGTAAAAATTTTACAGAAGGAATTGCTGTAATATTTA  178
G43      GAGCATGTCCTAAC TATAAACTTGGTAAAAATTTAACAGAAGGAATTGCTGTAATATTTA  178
          *****

G14      AGGAAAATATTTCTCCTTATAAAATTTAAAGCTAATATATACTACAAAAATATTATTATCA  232
G44      AGGAAAATATTTCTCCTTATAAAATTTAAAGCTAATATATACTACAAAAATATTATTATCA  230
G24      AGGAAAATATTTCTCCTTATAAAATTTAAAGCTAATATATACTACAAAAATATTATTATCA  230
G23      AGGAAAATATTTCTCCTTATAAAATTTAAAGCTAATATATACTACAAAAATATTATTATCA  237
G13      AGGAAAATATTTCTCCTTATAAAATTTAAAGCTAATATATACTACAAAAATATTATTATCA  238
G43      AGGAAAATATTTCTCCTTATAAAATTTAAAGCTAATATATACTACAAAAATATTATTATCA  238
          *****

G14      CCACTGTATGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAATTATTAATAGATATACAGATCGTGTAC  292
G44      CCACTGTATGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAATTTTAAATAGATATACAGATCGTGTAC  290
G24      CCACTGTATGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAATTATTAATAGATATACAGATCGTGTAC  290
G23      CCACTGTATGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAATTACTAATAGATATACAGATCGTGTAC  297
G13      CCACTGTATGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAATTACTAATAGATATACAGATCGTGTAC  298
G43      CCACTGTATGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAATTACTAATAGATATACAGATCGTGTAC  298
          *****
```

G14 CTATAGGTGTTCC TGAATTACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTAT-TT-TTATC-ACAG 349
 G44 CTATAGGTGTTCC TGAATTACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTTT-TTGTTTTT-TCAG 348
 G24 CTATAGGTGTTCC TGAATTACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTATGTTTTTATCCAAAG 350
 G23 CTATAGGTGTTCC TGAATTACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTATGTGTTTTATCAAAG 357
 G13 CTATAGGTGTTCC TGAATTACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTATGTGTTTTATCAAAG 358
 G43 CTATAGGTGTTCC TGAATTACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTATGTGTTTTATCAAAG 358
 ***** * * ** ** **

G14 CCGCGTTAT-TTCG-AATGTATTTTGAATTTTTTGCATTTGATAAGGATGAAGACCCCC- 406
 G44 CCGGGCTAA-TTCGTGATGAATTT-GAATTTTCCGCATTTGATAAGGATGAAGACCCCG- 405
 G24 CCGCTATAT-TTCGTGATA-ATTTTGAATTTCCCGCATTTGATAAGGATGAAGACCCCC- 407
 G23 CTG-ATTATATTCGTAATA-ATTATGAATTTACCGCATTTGATAAGGATGAAGACCCCA- 414
 G13 CTG-ATTATATTCGTAATA-ATTATGAATTTACCGCATTCGAAAAGGACGAAGACCCCC- 415
 G43 CTG-ATTATATTCGTAATA-ATTATGAATTTACCGCATTTGATAAGGATGAAGACCCCA 416
 * * ** **** * * ** ***** ***** * * ***** *****

G14 GAGAAGTGTTCCTAAAGCCCA 428
 G44 GAGAAGTTTTTTTTTAAAGCCCA 427
 G24 GAGAAGTTTTTTTTTAAAGCCCA 429
 G23 GAGAAGTTCATTTTAAAGCCCA 436
 G13 GAGAAGTTCATTTTAAAGCCC- 436
 G43 GAGAAGTTCATTTTAAAGCCCA 438
 ***** ** *****

Secuencia de Consenso.

>LCM

AGCTTCGGATGATATTCGGGAAATTTAGGTGAATCCCAAATTGAATCTGATGATACAT
 CAACATTTTACAGGGACCCACCACAATTCGGGATCAACATTGGTGCGTTTGGAGCCACCT
 AGAGCATGTCCTAACTATAAACTTGGTAAAAATTTTACAGAAGGAATTGCTGTAATATT
 TAAGGAAAATATTTCTCCTTATAAATTTAAAGCTAATATACTACAAAAATATTATTAT
 CACCACTGTATGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAATTACTAATAGATATACAGATCGTG
 TACCTATAGGTGTTCC TGAATTACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTATGTGTTTTATCA
 AAAGCTGATTATATTCGTAATAATTATGAATTTACCGCATTTGATAAGGATGAAGACC
 CAGAGAAGTTCATTTAAAGCCCA

ANEXO 12:

a) Alineamiento de la secuencia de consenso y la secuencia del GenBank AF361073.

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

LCM          -AGCTTCGGATGATATTCGGGAAATTTTAGGTGAATCCCAAATTGAATCTGATGATACAT  59
AF361073     CTACTTCGGATGATATTCGTGAAATTTTACGTGAATCCCAAATTGAATCTGATGATACAT  60
              *****

LCM          CAACATTTTACAGGGACCCACCACAATCGGGATCAACATTGGTGCGTTTGGAGCCACCTA 119
AF361073     CAACATTTTACATGTGCCACCACCATCGGGATCAACATTGGTGCGTTTGGAGCCACCTA 120
              ***** *

LCM          GAGCATGTCCTAACTATAAACTTGGTAAAAATTTTACAGAAGGAATTGCTGTAATATTTA 179
AF361073     GAGCATGTCCTAACTATAAACTTGGTAAAAATTTTACAGAAGGAATTGCTGTAATATTTA 180
              *****

LCM          AGGAAAATATTTCTCCTTATAAAATTTAAAGCTAATATATACTACAAAAATATTATTATCA 239
AF361073     AGGAAAATATTTCTCCTTATAAAATTTAAAGCTAATATATACTACAAAAATATTATTATCA 240
              *****

LCM          CCACTGTATGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAATTACTAATAGATATACAGATCGTGTAC  299
AF361073     CCACTGTATGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAATTACTAATAGATATACAGATCGTGTAC  300
              *****

LCM          CTATAGGTGTTCTGAAATTACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTATGTGTTTATCAAAAG  359
AF361073     CTATAGGTGTTCTGAAATTACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTATGTGTTTATCAAAAG  360
              *****

LCM          CTGATTATATTCGTAATAATTATGAATTTACCGCATTTGATAAGGATGAAGACCCAGAG  419
AF361073     CTGATTATATTCGTAATAATTATGAATTTACCGCATTTGATAAGGATGAAGACCCAGAG  420
              *****

LCM          AAGTTCATTTAAAGCC--CA--  437
AF361073     AAGTTCATTTAAAGCCTTCAA  442
              ***** **
    
```

b) Porcentaje de identidad nucleotídica:

seqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	LCM	437	2	AF361073	442	97.0

ANEXO 13:

a) Alineamiento de la secuencia de consenso y la secuencia del GenBank AY582737.

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

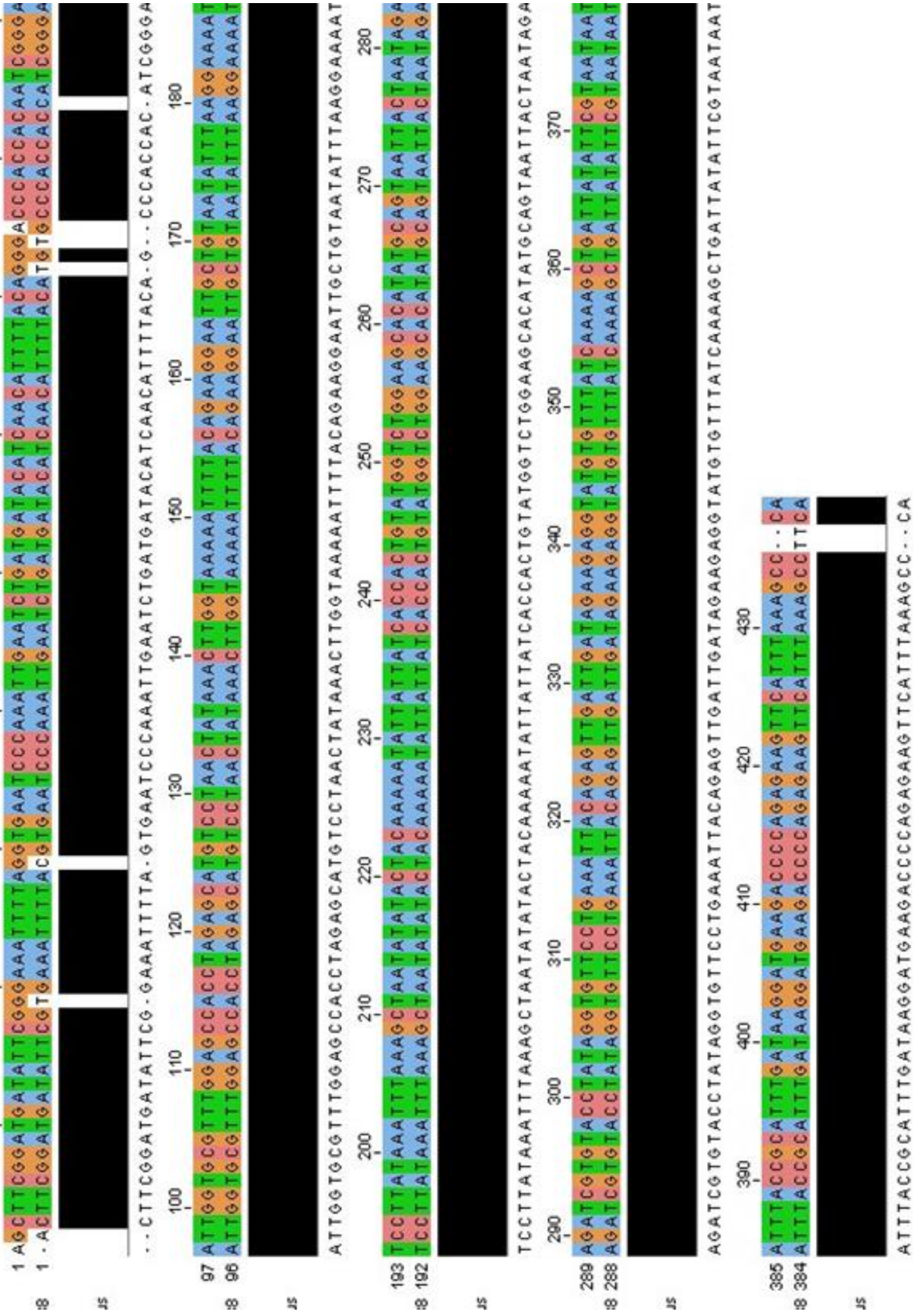
LCM          -AGCTTCGGATGATATTCGGGAAATTTTAGGTGAATCCCAAATTGAATCTGATGATACAT  59
AY582737     CTACTTCGGATGATATTCGTGAAATTTTACGTGAATCCCAAATTGAATCTGATGATACAT  60
              *****
LCM          CAACATTTTACAGGGACCCACCACAATCGGGATCAACATTTGGTGCGTTTGGAGCCACCTA 119
AY582737     CAACATTTTACATGTGCCACCACCATCGGGATCAACATTTGGTGCGTTTGGAGCCACCTA 120
              ***** *
LCM          GAGCATGTCCTAACTATAAACTTGGTAAAAATTTTACAGAAGGAATTGCTGTAATATTTA 179
AY582737     GAGCATGTCCTAACTATAAACTTGGTAAAAATTTTACAGAAGGAATTGCTGTAATATTTA 180
              *****
LCM          AGGAAAATATTTTCCTTATAAAATTTAAAGCTAATATATACTACAAAAATATTTATTTATCA 239
AY582737     AGGGAAAATATTTTCCTTATAAAATTTAAAGCTAATATATACTACAAAAATATTTATTTATCA 240
              *** *****
LCM          CCCTGTATGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAATTACTAATAGATATACAGATCGTGTAC  299
AY582737     CCCTGTATGGTCTGGAAGCACATATGCAGTAATTACTAATAGATATACAGATCGTGTAC  300
              *****
LCM          CTATAGGTGTTCCGTGAAATTACAGAGTTGATTGATAGAGAAGAGGTATGTGTTTATCAAAAG  359
AY582737     CTATAGGTGTTCCGTGAAATTACAGAGTTGATTGATAGAGAAGAGGTATGTGTTTATCAAAAG  360
              *****
LCM          CTGATTATATTCGTAATAATTATGAATTTACCGCATTGATAAGGATGAAGACCCAGAG  419
AY582737     CTGATTATATTCGTAATAATTATGAATTTACCGCATTGATAAGGATGAAGACCCAGAG  420
              *****
LCM          AAGTTCATTTAAAGCC--CA--  437
AY582737     AAGTTCATTTAAAGCCTTCAA  442
              ***** **

```

b) Porcentaje de identidad nucleotídica:

seqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	LCM	437	2	AY5827375	442	97.0

Anexo 14: Alineamiento de la secuencia de consenso LCM y da secuenciada del GenBank/AF361073. 80



9. BIBLIOGRAFÍA

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. 2008. *Inmunología celular y molecular*. 6ª ed. Elsevier. Madrid, España. 577 p

ALBERT, D.; LAHAV, M.; CARMICHAEL, L.; PERCY, D. 1976. Canine herpesvirus induced retinal dysplasia and associated ocular anomalies. *Invest. Ophthalmol.* 15(4): 267-278

ARNHEIM, N.; ERLICH, H. 1992. Polymerase Chain Reaction Strategy. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 131-156

BABIUK, L.; L'ITALIEN, J.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; ZAMB, T.; LAWMAN, M.; HUGHES, G.; GIFFORD, G. 1987. Protection of cattle from bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) infection by immunization with individual viral glycoproteins. *Virology* 159(1): 57-66

BELÁK, S.; BALLAGI-PORDÁNY A. 1993. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Vet Res Commun* 17(1): 55-72

BOEHMER, P.; LEHMAN, I. 1997. *Herpes simplex virus DNA replication*. [en línea] *Annu. Rev. Biochem.* 66: 347-384. <<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.biochem.66.1.347>>[consulta: 20-12-2009]

BURGESSER, K.; HOTALING, S.; SCHIEBEL, A.; ASHBAUGH, S.; ROBERTS, S.; COLLINS, J. 1999. Comparison of PCR, virus isolation, and indirect fluorescent antibody staining in the detection of naturally occurring feline herpesvirus infections. [en línea] *J. Vet. Diagn. Invest.* 11(2): 122-126. <<http://jvdi.org/cgi/reprint/11/2/122>>[consulta: 19-03-2010]

BURR, P.; CAMPBELL, M.; NICOLSON, L.; ONIONS, D. 1996. Detection of Canine Herpesvirus 1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 53(3-4): 227-237.

CABANA, E. 2008. *Veterinary necropsy procedures*. Veterinary Science & Medicine. Nueva Ecija, Philippines. 44 p.

CARMICHAEL, L.E.; STRANDBERG, I.D.; BARNES, F.D. 1965. Identification of a cytopathogenic agent infectious for puppies as a canine herpes virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 120(3): 644-650.

CARMICHAEL, L.; BARNES, F.; PERCY, D. 1969. Temperature as a factor in resistance of young puppies to canine herpesvirus. *J. Infect. Dis.* 120(6): 669-678.

CARMICHAEL, L.; GREENE, C. 1998. Canine Herpesvirus infection. **In:** Greene C.E. (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. 2nd ed. WB Saunders: London. pp. 28-32.

CARMICHAEL, L.; GREEN, C. 2000. Infección por herpesvirus canino. **In:** *Enfermedades infecciosas en perros y gatos*. 2a ed. México. pp. 31-36.

CARTER, G.R.; WISE, D.J.; FLORES, E.F. 2006. Herpesviridae. **In: A Concise Review of Veterinary Virology**, G.R. Carter, D.J. Wise and E.F. Flores (Eds.) Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA.

DAVISON, A. 2002. Evolution of the herpesviruses. *Vet. Microbiol.* 86(1-2): 69-88.

DAVISON, A.; DARGAN, D.; STOW, N. 2002. Fundamental and accessory systems in herpesviruses. *Antiviral. Res.* 56: 1-11.

DAVISON, A.; EBERLE, R.; EHLERS, B.; EXISTEWARD, G.; MCGEOCH, D.; MINSON, A.; PELLETT, P.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M.; THIRY, E. 2009. The order *Herpesvirales*. [en línea]. *Arch. Virol.* 154: 171-177.

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T2H-46T2B2Y-2-9&_cdi=4919&_user=5741700&_pii=S0166354202001079&_origin=search&_coverDate=10%2F31%2F2002&_sk=999439998&_view=c&_wchp=dGLbVtbzSkzS&_md5=99c07d210302243925f73b4534d04158&_ie=/sdarticle.pdf> [consulta: 19-03-2010]

DAVISON, A. 2010. Herpesvirus systematics. [en línea]. *Vet. Microbiol.* 143(1): 52-69.

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TD6-4YC80RW-8-9&_cdi=5190&_user=5741700&_pii=S0378113510000908&_origin=search&_coverDate=06%2F16%2F2010&_sk=998569998&_view=c&_wchp=dGLzVtb-zSkzS&_md5=31c115e7fe12430fc78fcdf61a8fdbcf&_ie=/sdarticle.pdf> [consulta: 14-04-2010]

DIEFFENBACH, C.; DVEKSLER, G. 1993. Setting up a PCR laboratory.[en línea]. *Genome Res.* 3: S2-S7. <<http://genome.cshlp.org/content/3/2/S2.full.pdf>> [consulta: 26-10-2010]

DUMON, C.; MIMOUNI, P. 2005. Mortinatalidad asociada a enfermedades infecciosas en la cría canina: brucelosis, herpesvirosis, micoplasmosis. **In: Enciclopedia Veterinaria**, Lafont A.; Durieux F. Ed. Elsevier. E-RE 2250 (1-7 pp).

DIAKIDI-KOSTA, A.; MICHAILIDOU, G.; KONTOGOUNIS, G.; SIVROPOULOU, A.; ARSENAKIS, M. 2003. A single amino acid substitution in the cytoplasmic tail of the glycoprotein B of herpes simplex virus 1 affects both syncytium formation and binding to intracellular heparan sulfate.[en línea]. *Virus Res.* 93: 99-108. <

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T32-485XS5P-1-F&_cdi=4934&_user=5741700&_pii=S0168170203000704&_origin=search&_coverDate=05%2F31%2F2003&_sk=999069998&_view=c&_wchp=dGLbVzb-zSkzS&_md5=5d5e15db54f6b5f7bfce0fd43c8467bb&_ie=/sdarticle.pdf> [consulta: 28-06-2010]

ERLES, K.; DUBOVI, E.; BROOKS, H.; BROWNLIE, J. 2004. Longitudinal Study of Viruses Associated with Canine Infectious Respiratory Disease. *J. Clin. Microbiol.* 42(10): 4524-4529

ERLICH, H. A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. J. 1991. Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science* 252(5013): 1643-1651.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. 2007. European public assessment report (EPAR) Eurican Herpes 205. [en línea].

<http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/veterinary/000059/WC500066408.pdf> [consulta: 30-04-2010]

FENNER, F.; BACHMANN, P.A.; GIBBS, E.P.J.; MURPHY, F.A.; STUDDERT, M.J.; WHITE, D.O. 1992. Virología veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 691 p.

FUENTES, A. 2010. Determinación del gen UL37 del virus herpes canino mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 52 p.

GALOSI C. 2007. Herpesvirus canino 1: Agente etiológico y enfermedad. *Analecta Vet.* 27 (2): 28-35.

GELDARD, H.; GEERING, W.; BAGUST, T. 1971. Isolation of a herpesvirus from neonatal dogs in Australia. *Aust. Vet. J.* 47(6):286-288.

GENEKAM BIOTECHNOLOGY AG. 2007. Ready to use PCR kits (DNA viruses). [en línea]. <http://www.genekam.de/tex_e/main/main_dnaviruses.htm> [consulta: 06-10-2010].

GIBBS, R. A. 1990. DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction. [en línea]. *Anal. Chem.* 62(13): 1202-1214. <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac00212a004>> [consulta: 22-10-2010].

GONGORA, V.; SANDOVAL, N.; MANCHEGO, A. 2007. Evidencia serológica de la presencia del virus herpes canino tipo 1 en la provincia de Lima. *Rev. Investig. Vet. Peru.* 18 (2): 154-157.

GREEN, C.; WATSON, A. 2000. Fármacos antivirales. **In:** Enfermedades infecciosas en perros y gatos. 2ª ed. México. pp. 7-10.

GRIFFIN, B.; VERWEIJ, M.; WIERTZ, E. 2010. Herpesviruses and immunity: The art of evasion. [en línea] *Vet. Microbiol.* 143(1): 89-100. <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TD6-4YG7JVP-1-3&_cdi=5190&_user=5741700&_pii=S0378113510000933&_origin=search&_coverDate=06%2F16%2F2010&_sk=998569998&view=c&wchp=dGLzVtb-zSkWb&md5=f9955ed5be1429b60cd734b2ca5e186f&ie=/sdarticle.pdf> [consulta: 22-06-2010].

HASHIMOTO, A.; HIRAI, K.; MIYOSHI, A.; SHIMAKURA, S.; YAGAMI, K.; KATO, N.; KUNIHIRO, K.; FUJIURA, A.; KITAZAWA, K.; OKADA, K.; FUJIMOTO, Y. 1978. Naturally occurring canine herpesvirus infection in Japan. [en línea]. *Jpn. J. Vet. Sci* 40:157-169. <<http://rms1.agsearch.agropedia.affrc.go.jp/contents/JASI/pdf/society/17-2333.pdf>> [consulta: 29-04-2010].

HEID, C.; STEVENS, J.; LIVAK, K.; WILLIAMS, P. 1996. Real time quantitative PCR. [en línea]. *Genome Res.* 6(10): 986-994. <<http://genome.cshlp.org/content/6/10/986.full.pdf+html>> [consulta: 28-12-2010]

HILL, H.; MARÉ, C. 1974. Genital disease in dogs caused by canine herpesvirus. *Am. J. Vet. Res.* 35(5): 669-673.

IDEXX LABORATORIES. 2007. IDEXX Real PCR™ Canine Respiratory Disease (CRD) Panel from IDEXX Reference Laboratories. [en línea]. <http://www.idexx.com/view/xhtml/en_us/smallanimal/reference-laboratories/testmenu/innovative-tests/real-pcr.jsf?selectedTab=Tests> [consulta: 06-10-2010]

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. 2009. Virus Taxonomy 2009 [en línea]. <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>> [consulta: 19-12-2009]

KAWAKAMI, K.; OGAWA, H.; MAEDA, K.; IMAI, A.; OHASHI, E.; MATSUNAGA, S.; TOHYA, Y.; OHSHIMA, T.; MOCHIZUKI, M. 2010. Nosocomial outbreak of serious canine infectious tracheobronchitis (Kennel cough) caused by canine herpesvirus infection. *J. Clin. Microbiol.* 48(4): 1176-1181.

KIMBER, K.; KOLLIAS, G.; DUBOVI, E. 2000. Serologic survey of selected viral agents in recently captures American river otters (*Lontra canadensis*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 31(2): 168-175.

LABORATORIO D'ANALISI VETERINARIE SAN MARCO. 2008. Biología molecular para enfermedades infecciosas. [en línea]. <<http://www.sanmarcovet.it/pagina.asp?m1=211&m2=863>> [consulta: 06-10-2010]

LACHERETZ, A.; COGNARD, S. 1998. Épidémiologie et diagnostic sérologique de l'herpésivirose canine. *Revue Méd. Vét.* 149(8-9): 853-856.

LARENAS, J.; SANTIBÁÑEZ, M.C.; BERRÍOS, P. 1992. Primeros antecedentes en Chile de infección por herpes canino con mortalidad neonatal. *Mevepa* 6(1): 13-16.

LIMBACH, K.; LIMBACH, P.; CONTE, D.; PAOLETTI, E. 1994. Nucleotide sequence of the genes encoding the canine herpesvirus gB, gC and gD homologues.[en línea] *J. Gen. Virol.* 75(8): 2029-2039. <<http://vir.sgmjournals.org/cgi/reprint/75/8/2029>> [consulta: 19-03-2010]

LUST, G.; CARMICHAEL, L. 1974. Properties of canine herpesvirus DNA. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 146(1): 213-217.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. 2003. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª ed. Pearson. Madrid, España. 1011 p.

MC GEOCH, D.J.; COOK, S. 1994. Molecular phylogeny of the Alpha herpesvirinae subfamily and a proposed evolutionary timescale. *J. Mol. Biol.* 238(1): 9-22.

MCGEOCH, D.J.; COOK, S.; DOLAN, A.; JAMIESON, F.E.; TELFORD, E.A.R. 1995. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J. Mol. Biol.* 247(3): 443–458.

MCGEOCH, D.J.; DAVISON, A.J. 1999. The molecular evolutionary history of the herpesviruses. **In:** Domingo, E., Webster, R., Holland, J. (Eds.), *Origin and Evolution of Viruses*. Academic Press, London, pp. 441–465.

METTENLEITER, T.C.; SPEAR, P.G. 1994. Glycoprotein gB (gII) of pseudorabies virus can functionally substitute for glycoprotein gB in herpes simplex virus type 1.[en línea] *J. Virol* 68(1): 500-504. < <http://jvi.asm.org/cgi/reprint/68/1/500> > [consulta: 18-12-2009]

METTENLEITER, T. 2003. Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. [en línea]. *Virus Res.* 92(2): 197-206. <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T32-47X24TM-1-F&_cdi=4934&_user=5741700&_pii=S0168170202003520&_origin=search&_coverDate=04%2F30%2F2003&_sk=999079997&_view=c&_wchp=dGLzVtz-zSkzV&_md5=1cb3d4e3a1d1d94f5ae46e64ab30ed10&_ie=/sdarticle.pdf> [consulta: 26-03-2010]

MIFFLIN, T. E. 2003. Setting Up a PCR Laboratory. **In:** Dieffenbach, C.; Dveksler, G. (Eds.). *PCR Primer: a laboratory manual*. 2th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York, USA. pp. 5-14.

MULLIS, K.; FALOONA, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155: 335–350.

MURPHY, F.A.; GIBBS, E. PJ.; HORZINEK, M.C; STUDDERT, M.J. 1999. *Veterinary virology*. 3th ed. Academic Press. London, Inglaterra. 629 p.

NAVARRO, C.; CELEDÓN, M.; PIZARRO, J. 2003. Detección de virus herpes canino tipo 1 en Chile. *Arch. Med. Vet.* 35(2): 227-231.

NAVARRO, C.; CELEDÓN, M.; PIZARRO, J.; GAGGERO, A. 2005. Virus herpes canino en Chile: Propiedades biológicas. *Arch. Med. Vet.* 37(2): 133-137.

PELLETT, P. E.; ROIZMAN, B. 2007. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. **In:** Knipe, D.; Howley, P. (Eds.) *Fields Virology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins. pp. 2480-2499.

PLUMMER, G.; GOODHEART, C.; HENSON, D.; BOWLING, C. 1969. A comparative study of the DNA density and behavior in tissue cultures of fourteen different herpesviruses. *Virology* 39(1): 134-137.

POULET, H.; GUIGAL, P.; SOULIER, M.; LEROY, V.; FAYET, G.; MINKE, J.; CHAPPUIS, G. 2001. Protection of puppies against canine herpesvirus by vaccination of the dams. *Vet. Rec.* 148(22): 691-695.

THE NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2003a. GenBank Overview [en línea]. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>> [consulta: 25-08-2010]

THE NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2003b. Canine herpesvirus glycoprotein B (gB) gene, complete cds [en línea]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=nucleotide&dopt=GenBank&list_uids=13958998> [consulta: 01-01-2010]

RÉMOND, M.; SHELDRIK, P.; LEBRETON, F.; NARDEUX, P.; FOULON, T. 1996. Gene organization in the U_L region and inverted repeats of the canine herpesvirus genome. [en línea]. *J. Gen. Virol.* 77(1): 37-48. <<http://vir.sgmjournals.org/cgi/reprint/77/1/37>> [consulta: 29-09-2010]

REUBEL, G.; PEKIN, J.; WEBB-WAGG, K.; HARDY, C. 2002. Nucleotide sequence of glycoprotein genes B, C, D, G, H and I, the thymidine kinase and protein kinase genes and gene homologue UL24 of an Australian isolate of canine herpesvirus. *Virus Genes* 25(2): 195-200.

REUBEL, G.; PEKIN, J.; WRIGHT, J.; VENABLES, D.; FRENCH, N. 2004. Corticosteroid treatment does not reactivate canine herpesvirus in red foxes. *J. Wildl. Dis.* 40(2): 238-248.

RONSSSE, V.; POULET, H.; VERSTEGEN, J.; THIRY, E. 2003. L'herpès-virose canine. [en línea]. *Ann. Méd. Vét.* 147: 65-76. <http://les.amis.de.lancelot.jed.st/maladies/herpersvirose_canine.pdf> [consulta: 05-05-2010]

RONSSSE, V.; VERSTEGEN, J.; ONCLIN, K.; FARNIR, F.; POULET, H. 2004. Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1). *Theriogenology* 61(4): 619-636.

RONSSSE, V.; VERSTEGEN, J.; THIRY, E.; ONCLIN, K.; AEBERLE, S.; BRUNET, S.; POULET, H. 2005. Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. *Theriogenology* 64(1): 61-74.

SCHULZE, C.; BAUMGÄRTNER, W. 1998. Nested polymerase chain reaction and *in situ* hybridization for diagnosis of canine herpesvirus infection in puppies. [en línea]. *Vet. Pathol.* 35(3): 209-217. <<http://vet.sagepub.com/content/35/3/209.full.pdf+html>> [consulta: 05-04-2010]

STORCH, G. A. 2007. Diagnostic Virology. **In:** Knipe, D.; Howley, P. (Eds.) *Fields Virology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins. pp. 565-604.

STRANDBERG, J.; CARMICHAEL, L. 1965. Electron microscopy of a canine herpesvirus. *J. Bacteriol.* 90(6): 1790-1792.

THOMPSON, J.; HIGGINSS, D.; GIBSON, T. 1994. Clustal W: Improving the sensitivity progressive multiple sequence alignments through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22): 4673-4680.

TORRES, A. G.; BACA, B. E. 1995. Reacción en cadena de la polimerasa. *Elementos* 23(3): 16-21.

WEIZHONG, C.; BAOHUA, G.; PERSON, S. 1988. Role of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 in viral entry and cell fusion. *J Virol.* 62(8): 2596-2604.

WISE, D.; CARTER, G.; FLORES, E. 2006. Prevención de las enfermedades virales, vacunas y fármacos antivirales. **In: A Concise Review of Veterinary Virology**, G.R. Carter, D.J. Wise and E.F. Flores (Eds.) Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA.

XUAN, X.; HORIMOTO, T.; LIMCUMPAO, J.; TOHYA, Y.; TAKAHASHI, E.; MIKAMI, T. 1992. Glycoprotein-specific immune response in canine herpesvirus infection: Brief report. [en línea]. *Arch. Virol.* 122(3-4): 359-365. <<http://www.springerlink.com/content/m8kprm240728v762/fulltext.pdf>> [consulta: 13-08-2010]