



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



**IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DIAGNÓSTICA
MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DEL GEN DE LA
GLICOPROTEÍNA B DEL VIRUS HERPES FELINO**

**IMPLEMENTATION OF A MOLECULAR DIAGNOSTIC
TECHNIQUE FOR THE DETECTION OF THE
GLYCOPROTEIN B GENE OF FELINE HERPES VIRUS**

CONSTANZA ISABEL SEPÚLVEDA ESTAY

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

PROFESOR GUÍA
CARLOS NAVARRO VENEGAS

FINANCIAMIENTO
PROGRAMA AUCAI 2011

SANTIAGO, CHILE
2012



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



IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DIAGNÓSTICA
 MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DEL GEN DE LA
 GLICOPROTEÍNA B DEL VIRUS HERPES FELINO

CONSTANZA ISABEL SEPÚLVEDA ESTAY

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : CARLOS NAVARRO VENEGAS
PROFESOR CONSEJERO: CONSUELO BORIE POLANCO
PROFESOR CONSEJERO: LORETO MUÑOZ ARENAS

SANTIAGO, CHILE
 2012

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres, por el apoyo incondicional en esta larga etapa de la vida. ¡Gracias por creer siempre en mí, sin ustedes no habría logrado todas estas metas!

A mi Profesor guía, por creer en los alumnos de esta Facultad a pesar de cualquier dificultad. Gracias por apoyarnos siempre.

A mi familia entera: hermanos, cuñadas y sobrinos, por creer en este sueño loco y estar siempre a mi lado.

A Dios, por hacerme la persona que soy, y darme la fuerza para seguir adelante a pesar de todas las circunstancias.

¡GRACIAS INFINITAS!

RESUMEN

Existe una amplia variedad de patologías que afectan a los gatos domésticos, generando gastos económicos por parte de sus dueños en busca de soluciones y la eventual mejoría de sus mascotas. Dentro de todas éstas, el virus herpes felino tipo 1 (VHF-1) uno de los agentes etiológicos del llamado complejo respiratorio felino, genera múltiples problemas en los gatos domésticos, dejando incluso secuelas importantes que afectan posteriormente su calidad de vida. Además, por ser un patógeno altamente distribuido alrededor del mundo y de fácil transmisión, existe un gran porcentaje de animales infectados y por su característica de patógeno latente, continúa distribuyéndose sin control a través de las poblaciones de gatos.

En la clínica de animales pequeños su diagnóstico es en base a los signos clínicos presentados por los gatos afectados, existiendo hasta la fecha en Chile sólo una forma de diagnóstico de laboratorio específico para identificar el agente que no se utiliza rutinariamente en clínica. Por lo anterior, el tratamiento generalmente se basa en el conocimiento y experiencia del médico veterinario tratante, sin confirmación real del agente que está actuando.

Por esta razón, en esta memoria de título se propuso implementar un método de diagnóstico molecular alternativo en gatos menores de un año de edad con signología clínica correspondiente a infección con VHF-1. Para ello se realizó la detección del gen de la glicoproteína B del virus a través de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y se determinó el porcentaje de identidad nucleotídica (PIN) del segmento obtenido, comparándolo con datos de la base genómica online Genbank®.

De los once gatos analizados, en solo uno de ellos se logró amplificar un segmento correspondiente al gen de la glicoproteína B. El valor de PIN obtenido (96%) validaría que el segmento obtenido corresponde al gen de la glicoproteína B del VHF-1. Se discute la eficiencia del método implementado.

Palabras clave: virus herpes felino, gen glicoproteína B, complejo viral felino, diagnóstico.

ABSTRACT

There are a wide variety of pathologies that affect domestic cats, which translate in economic investments for their owners in search of solutions and recovery of their pets. Of all these, feline herpes virus type 1, one of the agents of feline respiratory complex, generates multiple problems in domestic cats, and as a result of this the animal ends up with consequences that affects their future health quality. This virus is widely distributed around the world and of easy transmission, so there is a large percentage of infected animals worldwide, and since it's a latent pathogen, it continues to spread throughout the cat population without control.

In small animal clinic, the diagnosis is based on clinical signs presented by the affected cats, existing until today in Chile only one specific laboratory diagnostic method implemented to identify the agent, which is not used regularly in small animal clinic. Due to this, treatment and diagnosis is generally based on the knowledge and experience of the veterinarian in charge, leaving no real confirmation on which agent is causing the symptoms.

Due to this reason, this study wants to implement an alternative molecular diagnostic method, for which cats under one year of age were selected, presenting symptoms compatible to an infection with feline herpes virus. PCR method was used to detect the glycoprotein B gene of feline herpes virus type 1 followed by the determination of nucleotide identity percentage (PIN) compared to the official online gene database GenBank©.

Of the eleven cats studied, only one of them resulted in the amplification of a segment that corresponded to the glycoprotein B gene. The resulting PIN (96%) confirms that the sequence obtained corresponds to feline herpes virus type 1 glycoprotein B gene. The efficiency of the implemented method is discussed.

Keywords: feline herpes virus, glycoprotein B gene, feline respiratory complex, diagnosis.

INTRODUCCIÓN

Los virus han moldeado la historia y evolución de sus hospedadores. Prácticamente todos los organismos vivos, al ser estudiados cuidadosamente, contienen parásitos virales, y por lo tanto estas pequeñísimas entidades generan relaciones e interacciones significativas con todas las formas de vida (10). La presencia de un virus patógeno es evidenciada inicialmente por los efectos que produce en un hospedador, o en algunos casos, por los efectos producidos “in vitro” en cultivos celulares. Los virus pueden ser aislados de un paciente infectado a partir de material excretado o secretado, sangre u otros tejidos y, mediante inoculación experimental reproducir los síntomas originales en un hospedador idéntico, o bien otra patología en un hospedador sustituto o cultivo celular (6).

Virus herpes felino tipo 1 (VHF-1). Está distribuido mundialmente y solo se conoce un serotipo, pudiendo variar la virulencia entre cepas (33). El virus fue aislado por primera vez por Crandell y Mauer en el año 1958 en Estados Unidos de Norteamérica, desde gatos pequeños con afección respiratoria superior aguda (13). Es un virus ADN de doble hebra, con tamaño de 120-180 nm, y su estructura se compone del material genético, una cápside icosaédrica, el tegumento y una envoltura de naturaleza lipídica que contiene varias proteínas de membrana y glicoproteínas virales insertas (28). Pertenece al orden *Herpesvirales*, a la familia *Herpesviridae*, a la subfamilia *Alphaherpesvirinae* y al género *Varicellovirus*, los cuales tienden a ser altamente especie específicos y extremadamente susceptibles a desinfectantes de rutina ocupados en clínica de animales pequeños (14). Se inactiva a 37°C por 3 horas, y a 56°C por 5 minutos; a 4°C el virus permanece infectivo por al menos 5 meses y a 25°C permanece infectivo por al menos un mes (33). Al pertenecer a la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, el virus posee características que incluyen un rango de hospedadores reducido, ciclo reproductivo corto, rápida invasión en cultivos celulares, destrucción eficiente de las células infectadas, y la habilidad de establecer infecciones latentes en ganglios sensoriales primarios (7). El VHF-1 se relaciona antigénicamente con el virus herpes canino y los virus herpes de la foca 1 y 2, sin embargo, no existe evidencia de transferencia cruzada entre especies (33).

De manera similar a otros herpesvirus, el VHF-1 sintetiza numerosas glicoproteínas que luego son incorporadas a las membranas de las células infectadas y a la envoltura del virión. Estas glicoproteínas han sido caracterizadas y son conservadas entre diferentes herpesvirus

relacionados (27). Las glicoproteínas de herpesvirus median la unión del virión a la célula hospedadora y son extremadamente importantes en la infectividad viral, determinando además la especificidad según el subtipo del virus. Éstas también son críticas para la respuesta de defensa del paciente contra la infección (12). Pueden ser divididas operacionalmente en las llamadas glicoproteínas esenciales, cuya presencia es requerida para una replicación viral productiva en un cultivo celular, y las glicoproteínas no esenciales, las que son indispensables hasta cierto punto para la propagación viral en cultivos celulares (17).

Basado en el análisis de secuenciación del ADN, el monómero de la glicoproteína B (gB) consiste de 904 residuos aminoacídicos, incluyendo la señal de secuencia en el terminal N. Contiene un dominio N-terminal extracitoplasmático, un dominio C-terminal citoplasmático, y una región transmembrana (5). La gB está altamente conservada en todas las subfamilias de los herpesvirus y corresponde a una glicoproteína de membrana. Existe evidencia que indica que la gB juega un rol importante en los fenómenos de fusión de membrana durante la entrada del virus a la célula y también durante la fusión celular inducida por el virus. Ésta se expresa de manera conjunta con otras glicoproteínas (D, H y L) actuando todas de manera secuencial, donde la glicoproteína D está involucrada en la fase I (unión del virus a la superficie celular), la glicoproteína H/L en la fase II (interacción de la glicoproteína D con un receptor de entrada) y la gB en la fase III (fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula, liberando el complejo cápside-tegumento hacia el citoplasma de la célula infectada) (5). La función de la glicoproteína B es esencial para la entrada hacia las células objetivo, tanto para la infección por viriones libres como también para la diseminación directa célula a célula. Por esta razón, los viriones gB-negativos son biológicamente inertes (17).

Complejo respiratorio felino. Es una patología que afecta comúnmente a los gatos domésticos y los principales agentes patógenos asociados a esta enfermedad son dos virus altamente contagiosos: virus herpes felino tipo 1 (VHF-1) y calicivirus (19). Si bien el gato doméstico es el principal hospedador del VHF-1, el virus también ha sido aislado de guepardos y leones, se han detectado anticuerpos en pumas y no existiría evidencia de infección en humanos (33). Esta patología se presenta especialmente en gatos pequeños menores de seis meses, momento de la vida en el cual poseen un sistema inmune poco desarrollado (14) y debido a la naturaleza de su transmisión, se presenta sobre todo en animales que viven en criaderos, centros de rescate o albergues. Estos ambientes muchas veces contienen una mezcla de gatos portadores más viejos y

animales más jóvenes susceptibles. Los gatos son mantenidos en alta proximidad permitiendo la rápida diseminación viral entre los animales, y muchos de los factores estresantes que son conocidos como causantes de la reactivación del virus están presentes. Entre éstos se incluyen cambios en el hogar, parto, amamantamiento, y después de la administración de terapia inmunosupresiva o corticoesteroides (8). La forma de transmisión es por contacto directo, siendo las dos vías más comunes a través de gatos con infección aguda que liberan el virus al medio ambiente y a través de gatos con infección latente que están experimentando reactivación del virus y con ello diseminación al exterior. La infección transplacentaria no ha sido comprobada en la práctica. Las hembras con infección latente pueden transmitir el virus a sus camadas, ya que el parto y lactancia inducen periodos de estrés que pueden llevar a la reactivación del virus y con ello su liberación al medio ambiente. Por esta razón, los gatos pequeños pueden adquirir el virus muy tempranamente en su vida (33). El VHF-1 es un virus neuroepiteliotrópico, con afinidad por neuronas sensitivas y tejidos epiteliales (22) y realiza infección latente localizándose en el ganglio trigémino, desde donde pueden ocurrir infecciones oculares recrudescientes por la reactivación del virus, el cual viaja a través de los axones de la rama oftálmica del nervio trigémino hacia el ojo (31). Existe evidencia que sugiere que en muchas especies, incluyendo el gato, el herpesvirus podría estar presente en forma latente o inactiva en la córnea (22). Un alto porcentaje de gatos clínicamente normales han presentado ADN de VHF-1 en la córnea y conjuntiva. La reactivación muchas veces ocurre después de períodos de estrés naturales que puedan ocurrir en los animales (25). Se estima que sobre el 90% de la población felina es seropositiva al virus y al menos el 80% de los individuos infectados permanecen con infección latente de por vida, y, de éstos, un 45% libera virus al medio ambiente de manera intermitente durante su vida (14).

Signos clínicos. Pueden ser nasales, oculares y fiebre. Los signos clínicos agudos ocurren principalmente en gatos pequeños expuestos por primera vez al virus y desarrollan fiebre, letargia, inapetencia, estornudos, tos, descarga nasal y conjuntivitis con descarga ocular. La severidad de los signos varía según la cepa viral y tipo de exposición, edad de los gatos afectados, estado inmune, y susceptibilidad individual (29). Los signos oculares incluyen conjuntivitis, úlceras corneales, queratitis estromal, secuestro corneal y queratoconjuntivitis sicca (9). Se han descrito abortos por este virus y en neonatos la muerte es por encefalitis y hepatitis necrotizante focalizada (19). El VHF-1 tiende a localizarse solamente en la vía respiratoria alta no sobrepasando el área de laringe-tráquea. Una vez ocurrida la infección primaria, el virus replica

en las membranas mucosas de la nariz, laringe, tráquea, y tracto genital pero también en las conjuntivas (34). Después de un período de incubación de 24 a 48 horas empiezan los signos clínicos agudos mencionados anteriormente. La queratitis asociada con úlceras corneales perforadas es común. En gatos pequeños plenamente susceptibles de hasta cuatro semanas de edad, la rinitis extensa y una bronconeumonía asociada pueden ser fatales (16). La infección por VHF-1 en gatos mayores a seis meses de edad es probable que resulte en una infección leve o subclínica. Las hembras preñadas pueden abortar, aunque no existe evidencia que el virus cruce la placenta e infecte de manera fatal al feto, y además, el virus no ha sido aislado desde placentas o fetos abortados (16).

Diagnóstico. El diagnóstico presuntivo de la infección con VHF-1 se realiza muchas veces en base a los signos clínicos presentados. Ésta puede ser presumida cuando se observan úlceras dendríticas, que corresponden a lesiones patognomónicas en el animal afectado. La confirmación de la infección con VHF-1 requiere detección del virus en el laboratorio. Esta confirmación permite descartar la afección por parte de otros agentes infecciosos potenciales, así como también guiar el curso del tratamiento a realizar (25). Existen cuatro técnicas diagnósticas de laboratorio que se emplean para la detección de VHF-1: aislamiento viral, técnica de anticuerpos fluorescentes, técnicas serológicas, y PCR. El aislamiento viral detecta virus viable y no solo su ADN, el cual es cultivado a partir de torulados o raspados conjuntivales, nasales y faríngeos. Éste se considera el diagnóstico estándar de oro para el virus ya que replica rápidamente en las células y además produce efectos citopáticos característicos en el cultivo celular (14). Las muestras deben ser obtenidas antes de la aplicación de fluoresceína o rosa de bengala para la observación de úlceras en el paciente, ya que estas sustancias pueden inactivar el virus debido a que el pH que presentan (alrededor de 4.7) podría alterar la composición lipoproteica de la envoltura (32). Éstas deben ser enviadas de inmediato o bajo refrigeración al laboratorio, lo que se convierte en una dificultad en la aplicación práctica. La gran desventaja de este diagnóstico es su lentitud en comparación con otras técnicas (14). La técnica de anticuerpos fluorescentes detecta proteínas específicas del virus a través de anticuerpos marcados con fluorescencia. Estas muestras pueden ser tomadas tanto de frotis o biopsias conjuntivales o corneales, y se debe evitar la administración de fluoresceína antes de la toma de muestra, ya que esta puede dar resultados falsos positivos (33). Las principales limitaciones de esta técnica son baja sensibilidad, una diferencia de detección poco significativa entre animales sanos y enfermos, y la subjetividad del análisis de resultados con respecto a la determinación de fluorescencia (14). Durante las infecciones crónicas

y recurrentes, las dos pruebas mencionadas anteriormente muchas veces entregan resultados negativos (34). Las pruebas de detección de anticuerpos séricos (ELISA y pruebas de anticuerpos neutralizantes) se pueden realizar a partir de muestras como suero, humor acuoso y fluido cerebroespinal (20, 33). Éstas han demostrado ser de pobre o nulo valor diagnóstico para los cuadros por VHF-1 ya que, debido al uso masivo de la vacuna triple felina, la mayoría de la población de gatos será positiva. Además, se presentan títulos séricos altamente variables entre los distintos individuos por lo que la presencia de anticuerpos no se correlaciona con enfermedad e infección activa. Finalmente, la serología no distingue entre animales infectados y vacunados (29).

Basado en lo anterior, la técnica de detección de ADN como es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha sido extremadamente útil en el diagnóstico de VHF-1. Esta técnica molecular es utilizada para amplificar ácidos nucleicos generando múltiples copias de un segmento específico de ADN. Se parece al proceso natural de replicación del ADN donde el número de moléculas se duplica 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 (18). Esta técnica es sensible, con tasas de detección que van desde 50-100% para VHF-1 (3, 15, 23, 30) y específica, ya que detecta parte del genoma del patógeno de interés, pudiendo utilizarse en la detección de ADN viral desde muestras de los diferentes órganos afectados (24). La especificidad es lograda al diseñar partidores que se unan al objetivo y que sean del largo suficiente para que su secuencia sea única en el genoma. La sensibilidad es debido a que la técnica detecta cantidades pequeñas de virus presentes en la muestra (1).

Hasta la fecha en Chile existe sólo una prueba de diagnóstico en laboratorio para detectar VHF-1 que utiliza la detección del gen de la timidin kinasa (11), por lo tanto, esta memoria de título pretende implementar una técnica molecular alternativa para detectar el gen de la glicoproteína B del virus herpes felino tipo 1, como aporte al diagnóstico clínico.

MATERIALES Y METODOS

El proceso práctico fue realizado en los laboratorios de Virología y Microbiología Animal pertenecientes al Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Muestras

Las muestras utilizadas provinieron de 11 gatos raza Doméstico Pelo Corto, sin vacunas previas, y de edades menores de un año. Éstas fueron obtenidas por Macías (11) entre Enero y Junio del año 2011 y se contó con la asesoría de la Dra. Loreto Muñoz, especialista en Medicina de Felinos de la Universidad de Chile, para la selección de los animales sospechosos mediante examen clínico. Los animales fueron seleccionados por estar cursando un cuadro clínico agudo sospechoso de infección por VHF-1 y presentaron signos clínicos como: fiebre, conjuntivitis uni o bilateral, secreción mucopurulenta nasal y ocular, y úlcera corneal, siendo todos los anteriores mencionados típicos de una infección por VHF-1.

Para obtener la muestra se raspó suavemente con un hisopo estéril la mucosa conjuntival ventral de uno (muestras de gatos 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 y 11) o ambos ojos afectados (muestras de gatos 1 y 5), sin limpieza previa del ojo a muestrear. Luego, dentro de un plazo de 24 horas, se homogeneizó mediante un “vortex” el contenido del hisopo en un tubo con 200 µL de solución buffer salina fosfatada, lo que fue refrigerado a 4 °C hasta el momento de realizar la prueba de PCR. Las muestras fueron positivas a herpes felino según los resultados obtenidos en la memoria de título realizada por Macías (11).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se utilizó la muestra directa desde los animales afectados, sin requerir por lo mismo una extracción previa del ADN viral.

Partidores: se utilizaron partidores que detectan al gen de la glicoproteína B del VHF-1 y que generan un fragmento de 737 pares de bases (34), los cuales fueron encargados a la empresa Bioscan® para su elaboración. Los partidores utilizados fueron los siguientes:

<i>Forward primer: 5'-CCTAAACCTACTTCGGATGA-3'</i>

<i>Reverse primer: 5'-GGCTTTAAATGAACTTCTCTGG-3'</i>

Mezcla de reacción: se utilizó un kit comercial 2X PCR Master Mix (Fermentas®), que contiene la polimerasa termoestable, los desoxinucleotidos trifosfatos (dNTPs), el buffer de reacción y

MgCl₂. Para hacer la mezcla de reacción se utilizaron 15 µL de 2X PCR Master Mix, 5 µL de cada uno de los partidores y 5 µL de la muestra, con lo que se obtuvo un volumen total de 30 µL.

Amplificación del ADN: para implementar esta técnica se utilizó un termociclador Apollo (CLP, USA) de 96 pocillos de 0,2 ml. Se realizó un PCR cuyo protocolo consideró 35 ciclos (denaturación a 95°C por 2 minutos; alineamiento a 59°C por 1 minuto; extensión a 72°C por 1 minuto) y una etapa de elongación final a 72°C durante 10 minutos (34).

Visualización de los productos amplificados: este procedimiento se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Wrinkler®) en buffer Tris-borato (90 mM Tris-borato, 10 mM EDTA) como solvente. El producto obtenido del PCR se mezcló (6:1) con un producto comercial de carga llamado 6X Mass Ruler Loading Dye Solution (Fermentas®), que contiene glicerol que otorga mayor densidad a la muestra y azul de bromofenol para visualizar el progreso de la migración electroforética. Una alícuota de 6 µL de esta mezcla se depositó en el pocillo respectivo del gel. La electroforesis fue conducida a 90V por 45 minutos. Como marcador de tamaño molecular se utilizó un estándar que contiene fragmentos de ADN de entre 100 y 2000 pares de bases (Fermentas®). Después de realizada la electroforesis, el gel fue sometido a inmersión en bromuro de etidio (0,5 µg/ml) (Fermelo®) y las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminator UVP®) para luego ser fotografiadas.

Controles: como control positivo se utilizó el contenido de la vacuna triple felina Feligen CRP® (Virbac), la cual contiene virus atenuado de Calicivirus felino, virus de la Panleucopenia felina y virus de la Rinotraqueítis felina, que corresponde al virus herpes felino en una concentración de 10⁵-10⁷ DICT₅₀ (Dosis Infectante de Cultivo de Tejidos 50%). El contenido de la vacuna se resuspendió en 500 µL del diluyente recomendado por el fabricante. Como control negativo se utilizó una muestra de torulado ocular de un gato sano de dos años de edad, el mismo que utilizó Macias (11) en su memoria de título.

Medidas de Bioseguridad. El estudio se realizó de acuerdo a las reglas de bioseguridad establecidos para el laboratorio de Virología Animal, las que incluyen el uso de material limpio, eliminación de los desechos y utilización de delantal blanco cerrado y guantes durante el desarrollo del trabajo práctico. Para poder visualizar los geles se utilizó una placa de acrílico y

gafas con filtro UV, y luego de su uso, los geles incubados en bromuro de etidio se eliminaron mediante el uso de incineración, ya que el químico tiene propiedades mutagénicas.

Determinación de la identidad nucleotídica respecto a datos obtenidos desde GenBank®

Secuenciación: el fragmento purificado obtenido luego del ensayo PCR fue enviado al centro de secuenciación de la empresa Genytec.

Análisis: una vez recibidos los resultados se analizaron utilizando un programa *online* de acceso libre llamado Clustal W 2.0.12, el cual realizó la alineación del fragmento obtenido con la secuencia del gen gB de VHF-1 (código de acceso S49775.1) presente en el GenBank®, lo que proporcionó un porcentaje de identidad nucleotídica.

RESULTADOS

PCR. Al realizar el PCR (Figura 1 en Anexo 1) se pudo observar que solo una de las catorce muestras generó un fragmento de ADN de un tamaño cercano a los 700 pares de bases, logrando una banda visible nítida y ancha en el gel. Se obtuvo una sola banda en el carril correspondiente, lo que indica que no hubo amplificación inespecífica. El control positivo no generó una banda y por lo tanto, no pudo ser observada en el gel.

Análisis del fragmento secuenciado. El amplificado obtenido como resultado del ensayo PCR fue secuenciado de manera exitosa obteniendo 4 secuencias de DNA similares (Anexo 2) con las cuales se realizó un alineamiento múltiple de secuencias, lo cual permitió obtener una secuencia de consenso CSE (Anexo 3) que fue posteriormente comparado con los registros oficiales *online* de GenBank®. El resultado obtenido demostró un 96% de identidad nucleotídica con el fragmento de 3.240 pb del gen de la glicoproteína B del VHF-1 (Anexo 4).

DISCUSION

Los resultados obtenidos en esta memoria de título demuestran que efectivamente la técnica utilizada permite la detección del gen de la glicoproteína B de VHF-1. A pesar de esto, no se puede afirmar que esta técnica sea de elección para la detección del virus, pues del total de 14 muestras utilizadas, sólo la muestra número 5 fue positiva con una banda ancha y nítida (Figura 1 en Anexo 1). No obstante, el tamaño de banda obtenido de aproximadamente 737pb, la ausencia de otras bandas visibles en el gel, y el alto porcentaje de identidad nucleotídica (96%) del

fragmento secuenciado indican que los partidores utilizados son específicos para el gen de la glicoproteína B del VHF-1.

La única muestra positiva obtenida corresponde al gato que presentaba signos clínicos más severos visibles al momento de la obtención de muestra, presentando incluso blefaroespasmos y epistaxis. Considerando lo anterior se podría relacionar directamente la cantidad de virus presente con la aparición de la banda en el gel de agarosa. Por esta razón se puede asumir que la cantidad y gravedad de los signos clínicos tienen directa relación con la cantidad de virus excretado por el paciente. En estudios hechos con respecto a la sensibilidad de PCR, se discute que la detección del virus puede variar según la cantidad de virus presente en la muestra (15, 34). Los gatos infectados por VHF-1 excretan el virus en diferentes cantidades durante las distintas etapas de la enfermedad y se plantea que durante la infección aguda es el momento en que se excreta mayor concentración del virus, disminuyendo al tornarse crónica o recrudesciente (34). Llama la atención que con un protocolo de PCR anidado y con las mismas muestras, se ha logrado detectar el gen de la timidin kinasa del VHF-1 (11); ese estudio presentó una tasa de detección del 100% mientras que en el presente se obtuvo un 7%. Es por esta razón que el protocolo de PCR utilizado en esta memoria de título no sería de elección para detectar VHF-1. Se sugiere como posible explicación de la baja tasa de detección, en este estudio, la posibilidad de que las muestras hayan contenido virus con la glicoproteína B mutada. Un estudio de mutación de glicoproteína B en herpes simplex humano (21) llega a la conclusión que al mutar experimentalmente algunas zonas de dicha proteína se inhibe la entrada del virus a la célula objetivo, resultando entonces que el virus se hace no infeccioso y pierde la capacidad de entrar y por tanto replicar. Tomando en cuenta el alto grado de conservación de la glicoproteína B entre las distintas especies de virus herpes, es que esto se podría extrapolar a los resultados obtenidos en este estudio.

El control positivo no generó una banda visible en el gel, lo cual constituye un resultado no esperado. Algunos factores que pueden afectar la detección del PCR incluyen el número de ciclos utilizados, la selección de los partidores, la composición del buffer de reacción, las temperaturas de los ciclos (15) y la presencia de inhibidores de PCR en la muestra (4). Según un estudio realizado por Maggs y Clarke (15), se compararon seis protocolos de PCR, simples y anidados para el gen de la timidin kinasa; dando como resultado que la sensibilidad del protocolo está directamente relacionada con el número de ciclos realizados. Es decir, a mayor número de ciclos, mayor sensibilidad. El protocolo que resultó con mayor sensibilidad fue el que realizaba 70 ciclos

y el de menor sensibilidad fue el que realizaba 35 ciclos. Esta memoria de título utilizó un protocolo que realizaba 35 ciclos, por lo tanto esto podría explicar la baja sensibilidad obtenida. Los inhibidores han sido poco estudiados no obstante son un problema para la reacción mediante PCR que pueden presentarse a través de la falla total de la reacción o como la disminución de la sensibilidad en la detección. La inhibición puede originarse por distintas razones dentro de las cuales se mencionan condiciones de reacción poco controladas, fallas en la toma de muestra, contaminantes en los reactivos y contenedores, y contaminación no intencional durante la preparación de la reacción (36). No se intentó buscar otro control positivo para el estudio, por ejemplo alguna otra vacuna comercial, ya que se utilizaron las mismas muestras que Macías (11) para comparar la capacidad de detección de ambos protocolos. En el anterior, el control positivo sí logró generar una banda en el gel de agarosa durante el segundo PCR del protocolo anidado.

En Chile, actualmente no existen métodos implementados en clínica de animales pequeños para la detección del VHF-1, a pesar de ser una patología frecuente dentro de la población de gatos. Los resultados del presente estudio permiten enfatizar la búsqueda de protocolos con mayores tasas de detección. Según varios autores (15, 23, 30, 34) se plantea que la mejor técnica de detección hasta el momento es la utilización de PCR, siendo el protocolo más ampliamente utilizado la detección del gen de la timidin kinasa. El gen de la glicoproteína B ha sido menos estudiado y utilizado en diagnóstico en gatos, no obstante, existe evidencia de su utilización para la detección de herpesvirus en otras especies animales y también en el hombre (2, 26, 35). Para el diagnóstico de la traqueobronquitis canina se utiliza la detección del gen de esta glicoproteína para detectar al virus herpes canino tipo 1. Un estudio realizado en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (4) demostró una alta tasa de detección, dando como resultado un 100% de detección de las muestras utilizadas en PCR convencional. En otro estudio (35) desarrollado para detectar la glicoproteína del herpesvirus 4 en leche de bovinos se obtuvo una tasa de detección de 93%. Con estos datos se puede concluir que la detección mediante PCR convencional del gen de la glicoproteína B, proteína esencial en la entrada del virus a la célula hospedadora, es utilizada en otras especies con un alto porcentaje de éxito.

Para mejorar la tasa de detección utilizando la glicoproteína B se sugiere la utilización de un PCR anidado para un futuro estudio. Esta técnica utiliza un primer par de partidores que amplifican por varios ciclos iniciales un fragmento de ADN, que luego es usado como plantilla para una

segunda reacción, utilizando un segundo par de partidores (18). Esta reacción es altamente sensible ya que el segundo par de partidores sirven para verificar la especificidad del producto obtenido en los primeros ciclos.

CONCLUSIONES

El protocolo de PCR descrito permite la detección del gen gB del VHF-1 validado por el alto valor de PIN obtenido (96%). No obstante, éste no resulta ser el método diagnóstico de elección debido a su baja sensibilidad reflejado en una baja tasa de detección.

BIBLIOGRAFIA

1. **ARNHEIM, N.; ERLICH H.** 1992. Polymerase chain reaction strategy. Annual Review of Biochemistry. 61: 131-156.
2. **BLACK, D.; EBERLE, R.** 1997. Detection and differentiation of primate αherpesvirus by PCR. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 9: 225-231.
3. **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. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 11: 122-126.
4. **CARRASCO, L.** 2010. Memoria para la obtención del título de Médico Veterinario. Detección del gen de la glicoproteína B del virus herpes canino a través de la reacción de la polimerasa en cadena. Santiago. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 58 p.
5. **CAI, W.; BU, B.; PERSON, S.** 1988. Role of Glycoprotein B of Herpes Simplex Virus Type 1 in Viral Entry and Cell Fusion. Journal of Virology. 62: 2596-2604.
6. **CONDIT, R.** 2001 Principles of Virology. En: FIELDS, B.; HOWLEY, P.; GRIFFIN, D.; LAMB, R.; MARTIN, M.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.; KNIPE, D. Fields Virology. 4a ed. Estados Unidos, Lippincott Williams & Wilkins Publishers. pp. 25-58.
7. **FULMER, P.** 2007. Genetics of herpes simplex virus type-1 tegument proteins involved in virion morphogenesis and egress. [en línea] <http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-07112007-163816/unrestricted/Fulmer_dis.pdf> [consulta: 16-03-2011].
8. **HICKMAN, M.; REUBEL, G.; HOFFMAN, D.; MORRIS, J.; ROGERS, Q.; PEDERSEN, N.** 1994. An epizootic of feline herpesvirus, type 1 in a large specific pathogen-free cat colony and attempts to eradicate the infection by identification and culling of carriers. Laboratory Animals. 28: 320-329.
9. **KANG, B.; PARK, H.** 2008. Prevalence of feline herpesvirus 1, feline calicivirus and *Chlamydomphila felis* in clinically normal cats at a Korean animal shelter. Journal of Veterinary Science. 9: 207-209.
10. **LEVINE, A.** 2001. The origins of Virology. En: FIELDS, B.; HOWLEY, P.; GRIFFIN, D.; LAMB, R.; MARTIN, M.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.; KNIPE, D. Fields Virology. 4a ed. Estados Unidos, Lippincott Williams & Wilkins Publishers. pp. 3-24.

11. **MACIAS, P.** 2011. Memoria para la obtención del título de Médico Veterinario. Implementación de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidada para la detección del gen de la proteína timidin kinasa del virus herpes felino. Santiago. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 24 p.
12. **MAES, R.; FRITSCH, S.; HERR, L.; ROTA, P.** 1984. Immunogenic Proteins of Feline Rhinotracheitis Virus. *Journal of Virology*. 51: 59-262.
13. **MAEDA, K.; HORIMOTO, T.; MIKAMI, T.** 1998. Properties and Functions of Feline Herpesvirus Type 1 Glycoproteins. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 60: 881-888.
14. **MAGGS, D.** 2005. Update on Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Feline Herpesvirus Type 1. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 20: 94-101.
15. **MAGGS, D.; CLARKE, H.** 2005. Relative sensitivity of the polymerase chain reaction assays used for detection of feline herpesvirus and commercial vaccines. *American Journal of Veterinary Research*. 66: 1550-1555.
16. **MCLACHLAN, N.; DUBOVI, E.** *Herpesvirales*. En: MCLACHLAN, N.; DUBOVI, E. *Fenner's Veterinary Virology*. 4^a edición. Estados Unidos, Academic Press, 2011. pp. 179-201.
17. **METTENLEITER, T.** 2003. Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. *Virus Research*. 92: 197-206.
18. **MULLIS, K.; FALOONA, F.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 155: 335-350.
19. **MUÑOZ, L.** Complejo Respiratorio Viral Felino. En: RETAMAL, P.; ABALOS, P.; FREDES, F. *Enfermedades animales producidas por agentes biológicos*. Santiago, Editorial Universitaria. 2010. pp. 145-150.
20. **MURPHY, F.; GIBBS, E.; HORZINEK, M.; STUDDERT, M.** Laboratory diagnosis of viral diseases. En: MURPHY, F.; GIBBS, E.; HORZINEK, M.; STUDDERT, M. *Veterinary Virology*. 3^a ed. San Diego, Academic Press, 1999. pp. 197-223.
21. **ORTIZ DE ZARATE, I.; KAELIN, K.; ROZENBERG, F.** 2004. Effects of mutations in the cytoplasmic domain of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B on intracellular transport and infectivity. *Journal of Virology*. 78: 1540-1551.

22. **RAMSEY, D.** 2001. Ocular Manifestations of feline herpesvirus. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 3: 9-16.
23. **REUBEL, G.; RAMOS, R.; HICKMAN, M.** 1993. Detection of active and latent feline herpesvirus 1 infections using the polymerase chain reaction. *Archives of Virology*. 132: 409-420.
24. **RON SSE, V.; VERSTEGEN, J.; THIRY, E.; ONCLIN, K.; AEBERLE´C, S.; BRUNET, S.; POULET, H.** 2005. Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. *Theriogenology*. 64: 61–74.
25. **SANDMEYER, L.; WALDNER, C.; BAUER, B.; WEN, X.; BIENZLE, D.** 2010. Comparison of polymerase chain reaction tests for diagnosis of feline herpesvirus, *Chlamydomphila felis*, and *Mycoplasma* spp. infection in cats with ocular disease in Canada. *Canadian Veterinary Journal*. 51: 629-633.
26. **SINCLAIR, R.; BINNS, M.; CHIRNSIDE, E.; MUMFORD, J.** 1993. Detection of antibodies against equine herpesvirus types 1 and 4 by using recombinant protein derived from an immunodominant region of glycoprotein B. *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 265-271.
27. **SPATZ, S.; ROTA, P.; MAES, R.** 1994. Identification of the feline herpesvirus type 1 (FHV-1) genes encoding glycoproteins G, D, I and E: expression of FHV-1 glycoprotein D in vaccinia and raccoon poxviruses. *Journal of General Virology*. 75: 1235-1244.
28. **SPEAR, P.; EISENBERG, R.; COHENT, G.** 2000. Three Classes of Cell Surface Receptors for Alphaherpesvirus Entry. *Virology*. 275: 1-8.
29. **STILES, J.** 2003. Feline Herpesvirus. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 18: 178-185.
30. **STILES, J.; MCDERMOTT, M.; WILLIS, M.** 1997. Comparison of nested polymerase chain reaction, virus isolation, and fluorescent antibody testing for identifying feline herpesvirus in cats with conjunctivitis. *American Journal of Veterinary Research*. 58: 804-807.
31. **STILES, J.; POGRANICHNIY, R.** 2008. Detection of virulent feline herpesvirus-1 in the corneas of clinically normal cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 10: 154-159.

32. **STOREY, E.; GERDING, P.; SCHERBA, G.; SCHAEFFER, D.** 2002. Survival of equine herpesvirus-4, feline herpesvirus-1, and feline calicivirus in multidose ophthalmic solutions. *Veterinary Ophthalmology*. 5: 263-267.
33. **THIRY, E.; ADDIE, D.; BELAK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; HOSIE, M.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M.; RADFORD, A.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M.** 2009. Feline Herpesvirus Infection ABDC guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 11: 547-555.
34. **VÖGTLIN, A.; FRAEFEL, C.; ALBINI, S.; LEUTENEGGER, C.; SCHRANER, E.; SPIESS, B.; LUTZ, H.; ACKERMANN, M.** 2002. Quantification of Feline Herpesvirus 1 DNA in Ocular Fluid Samples of Clinically Diseased Cats by Real-Time Taqman PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 519-523.
35. **WELLENBERG, G.; VERSTRATEN, E.; BELÁK, S.; VERSCHUREN, S.; RIJSEWIJK, F.; PESHEV, R.; VAN OIRSCHOT, J.** 2001. Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase DNA by PCR assays in bovine milk. *Journal of Virological Methods*. 97: 101-112.
36. **WILSON, I.** 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3741-3751.

ANEXO 1

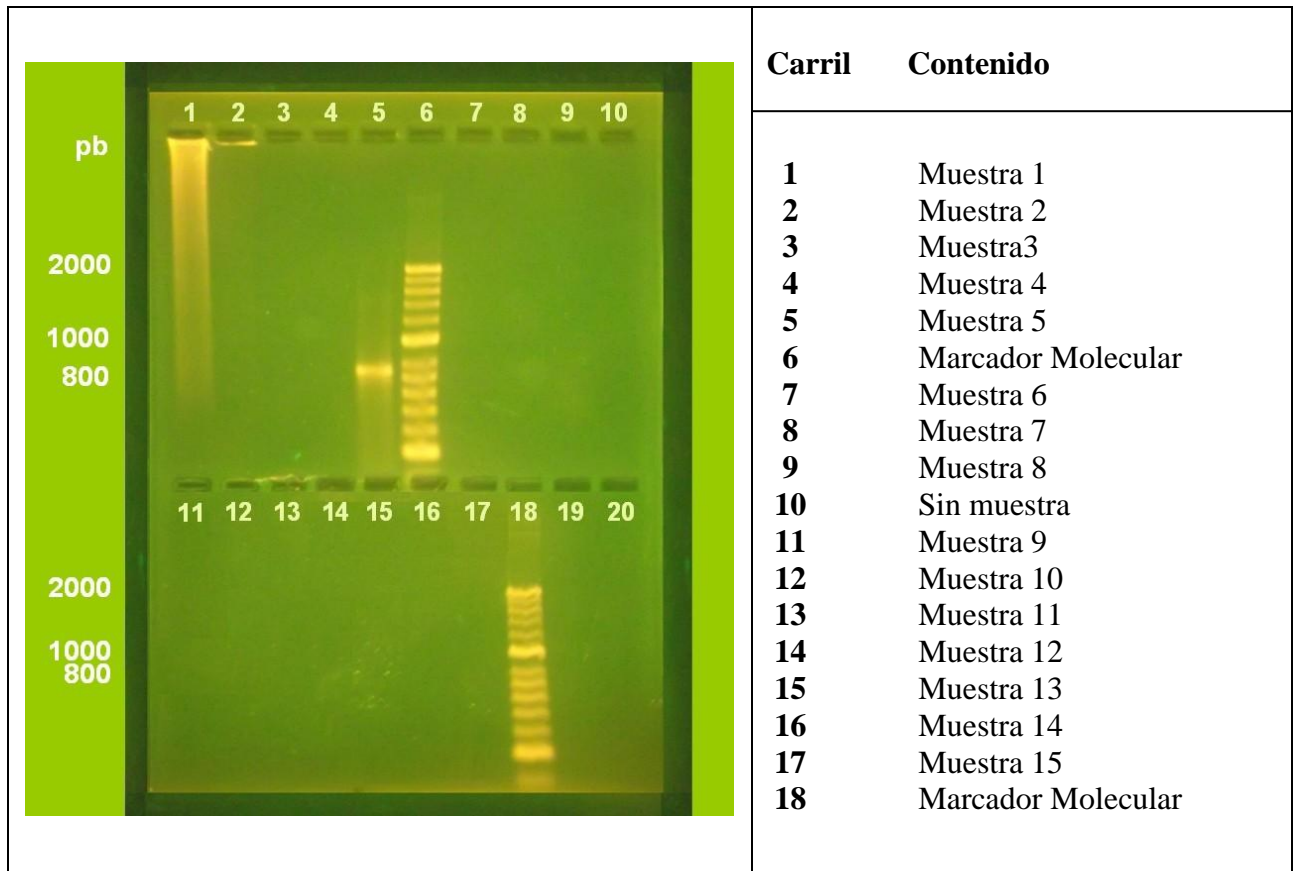


FIGURA 1. Detección del gen de la glicoproteína B mediante PCR convencional. Visualización de los resultados.

ANEXO 2

Resultados de secuenciación

CONI1

ATTCTAGAGAGAGATAAATAGTGGCTAAGGTACCATCGACATTTTATATGTGTCCA
CCACCTTCAGGATCTACTTACGTGCGTTTAGAGCCACCACGGGCCTGTCCAGATTA
TAAACTAGGGAAAAATTTTATAGAGGGTATATCTGTAATATTTAAAGAAAATATA
GCGCCATATAAATTCAAGGCTAATATATACTATAAAAACATTATTATGACAACTGT
ATGGTCTGGGAGTTCCTATGCTGTTTAAACCAACCGATATACAGACAGTGTTCCTCG
TGAAAGTTCAAGAGATTACAGATCTCATAGATAGACGGGGTATGTGCTTCTCGAA
AGCTGATTACGTTCGTAACAATTATCAATTTACGGCCTTTGATCGAGACGAGGATC
CCAGAGAACTGCCTCTGAAACCCTCTATTCCTTATATACACAGAGAGGG

CONI2

ATTCCTTATATACACAGAGAGGGATAGAGGCTAAGGGACCATCGACATTTTATAT
GTGTCCACCACCTTCAGGATCTACTTACGTGCGTTTAGTGCCACCACGGGCCTGTC
CAGATTATAAACTAGGGAAAAATTTTATAGAGGGTATAGCTGTAATATTTAAAGA
AAATATAGCGCCATATAAATTCAAGGCTAATATATACTATAAAAACATTATTATGA
CAACTGTATGGTCTGGGAGTTCCTATGCTGTTTAAACCAACCGATATACAGACAGG
GTTCCCGTGAAAGTTCAAGAGATTACAGATCTCATAGATAGACGGGGTATGTGCCT
CTCGAAAGCTGATTACGTTCGTAACACTATTATCAATTTACGGCCTTTGATCGAGACG
AGGATCTCCAGAGAACTGCTCTGAAACCCTCTTTCTTAAACACATACATTTACCAC
AAAT

CONI3

ATATACACATAAGAATAGAGGCTAAGGGACCATCGACTTTTTATATGTGTCCACCA
CCTTCAGGATCTACTTACGTGCGTTTAGAGCCACCACGGGCCTGTCCAGATTATAA
ACTAGGGAAAAATTTTATAGAGGGTATAGCTGTATTATTTAAAGAAAATATAGCG
CCATATAAATTCAAGGCTAATATATACTATAAAAATATTATTATGACAACGGTATG
GTCTGGGAGTTCCTATGCTGTTTAAACCAACCGATATTCAGACAGGGTTCCCGTGA
AAGTTCAAGAGATTACAGATCTCATAGATAGACGGGGTATGTGCCTCTCGATAGCT
GATTACGTTCGTAACAATTATCAATTTACGGCCTTTGATCGAGACGAGGATTCCAG
AGAAGTGCCTCTGAAACCCTCTATTCCTTAGAGAGATATTCCAATCGG

CONI4

GAGAGACACAGAGATATAGAATAGAGGCTAAGGGACCATCGACTTTTTATATGTG
TCCATCACCTTCAGGATCTACTTACGTGCGTTTAGAGCCACCACGGGCCTGTCCAG
ATTATAAACTAGGGAAAAATTTTATAGAGGGTATAGCTGTAATATTTAAAGAAAA
TATAGCGCCATATAAATTCAAGGCAAATATATACTATAAAAACATTATTATGATAA
CGGTATGGTCTGGGAGTTCCTATGCCGTTTAAACCAACCGATATACAGATAGGGTT
CCCGTGAAAGTTCAAGAGATTACAGATCTCATAGATAGACGGGGTATGTGTCTCTC
GAAAGCTGATTACGTTCGTAACAATTATCAATTTACGGCCTTTGATCGAGACGAGG
ATCCCAGAGAACTGCCTCTGAAACCCTCCATTTTACACAGGATTTGAGTTAA

