



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



**“DETERMINACION DEL GEN UL37 DEL VIRUS HERPES CANINO  
MEDIANTE LA REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA (PCR)”**

**ALEXIS ANDRÉS FUENTES ARCE**

**Memoria para optar al título  
profesional de Médico  
Veterinario. Departamento de  
Medicina Preventiva Animal.**

**PROFESOR GUÍA  
CARLOS OSVALDO NAVARRO VENEGAS**

**SANTIAGO – CHILE  
2010**

## DEDICATORIA

*A mis padres, Ester y José,  
A mis hermanos, Cristián y Roberto,  
A mi amigo Ito,  
A mi polola Luzmira(Mili),  
A mi Profesor Guía, Carlos Navarro  
A la doctora Ma. Antonieta Jara,*

*A mis amigos “Los Rancios”,  
A los amigos que gane a lo largo de todos los años en la facultad y a todos aquellos  
que durante mi vida estudiantil nunca perdieron su fe en mí.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero dar las gracias a la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, por creer en mí y darme la oportunidad de haber estudiado en esta casa de estudios.

Esta memoria ha requerido mucho esfuerzo y dedicación por mi parte y el profesor guía, sin embargo esta no hubiese sido posible sin la cooperación de las siguientes personas que me han apoyado durante el transcurso de mi vida personal y profesional.

Primero, quisiera agradecer a mis padres Ester y José por estar junto a mí, entregarme ese amor tan infinito que me tienen, creer y confiar en mis capacidades, por haber sido unos padres ejemplares al estar a mi lado tanto física y emocionalmente. Gracias papás por apoyarme en este gran proyecto tan importante de mi vida: Mi profesión.

Asimismo, quiero citar a mis hermanos, Cristián y Roberto, por estar junto a mí desde que nací, enseñarme a querer sin condiciones, a ser mejor persona, a jugármela por las cosas que quiero, a aprender el significado de ser hermano y a ser tolerantes unos con otros

A mi amigo Ito (Eduardo Castillo), por darme su apoyo infinito cuando lo necesite, entregarme una palabra de aliento y enseñarme empíricamente que a veces en la vida no es sólo familia aquellas personas que tienen un lazo sanguíneo con uno, sino que también aquellos que están con nosotros tanto en las buenas como en las malas y nos aceptan tal como somos: Gracias Hermano, porque eso significas para mí.

A mi polola Luzmira (Mili), gracias por estar junto a mi en el inicio de mi carrera dando mis primeros pasos juntos, cuando aun no conocía bien mis caminos y al llegar al final ahí estuviste a mi lado, juntos siendo uno, sin tu apoyo nada hubiese sido igual, por algo el destino nos unió para ojala juntos algún día alcanzar la felicidad absoluta, gracias por tu amor, comprensión y cariño, tu eres mi complemento y fuiste mi gran apoyo en los días difíciles. Te amo. Te adoro

A mi Profesor Guía, Carlos Navarro, ya que toda reunión en la “Sala de la Verdad” nos ayudó a crecer y aprender de nuestros errores, y de como en los tiempos “cuadrados” logramos esto. También, a la doctora Ma. Antonieta Jara, por su comprensión, consejos, apoyo emocional y enseñarme el “Aprender a aprender”.

A mis amigos “Los Rancios” (Felipe, Polilla, Prima, Wuascar, Negro y tantos amigos mas), ya que sin su apoyo nada de esto hubiese sido posible. Gracias amigos míos por todo y por todas esas celebraciones en los pastos de la facultad.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta memoria, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que de corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

## RESUMEN

En Chile, el virus herpes canino (CaHV-1) se ha detectado mediante técnicas clásicas de virología como aislamiento en cultivos celulares y posterior citólisis de las células afectadas, mediante inmunofluorescencia, por la presencia de cuerpos de inclusión o mediante estudios de cinética viral, lo cual ha permitido completar el análisis biológico de un aislado nacional denominado RP5. En contraste, en el presente trabajo se realizó la detección molecular del gen UL37 de CaHV-1, gen que codifica para la proteína UL37, presente en el tegumento del virus y que participa del ciclo replicativo viral. Para tal efecto, se utilizaron 6 inóculos virales obtenidos de sobrenadantes de cultivos celulares de la línea MDCK infectados con RP5. Para el PCR se utilizaron los partidores CHV-1: 5'-AAGAGCTCGTGTTAGTGAAAAT 3' y CHV-2: 5'-TAAACCCGCTGGATGATAC- 3' (Erles *et al.*, 2004). La visualización del amplicón se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %. La electroforesis se llevó a cabo a 90 volts por 90 minutos. Como marcador de tamaño molecular se utilizó un estándar que contiene fragmentos de ADN entre 100 y 1000 pb. Luego de la electroforesis, el gel se incubó en bromuro de etidio (0,5 µg/ml), posteriormente lavado, colocado en un transiluminador de luz ultravioleta y finalmente fotografiado. Todos los sobrenadantes de cultivos celulares utilizados resultaron positivos al PCR descrito, observándose una banda de alrededor de 500 pb, lo cual concuerda con lo descrito en la literatura al utilizar esta metodología.

Para tener una aproximación de la sensibilidad de la técnica empleada, se realizaron diluciones al décimo ( $10^{-1}$ - $10^{-8}$ ) del inóculo viral RP5 ( $DICT_{50} = 1,58 \times 10^6/mL$ ) y se determinó la dilución a la cual el PCR descrito no detectó el gen de la proteína UL37. Así, siete de las ocho diluciones resultaron positivas al PCR, observándose una banda de alrededor de 500 pb. Lo anterior indica que este método permitiría detectar hasta 0,00079  $DICT_{50}$ , lo que comparado con las 100  $DICT_{50}$  que se requieren para lograr la infección en células, sugiere una alta sensibilidad asociada al PCR.

El producto amplificado fue purificado, secuenciado y se determinó el porcentaje de identidad nucleotídica respecto a un fragmento del gen de la UL37 de virus herpes canino (GenBank accession number AY582738). Así, se determinó que entre la secuencia del GenBank y la secuencia de consenso del amplificado nacional existe un

94% de identidad nucleotídica. Adicionalmente, se comparó la secuencia obtenida con las de otras seis secuencias del gen UL37 presentes en cepas de herpes virus existentes en el Genbank y no se estableció un porcentaje de identidad mayor al obtenido respecto de las secuencias comparadas, lo cual sugiere que la secuencia obtenida en esta memoria de título pertenece al CaHV1.

Así, podemos concluir que esta metodología permite la detección de un amplicón de ADN con características compatibles con las descritas para el gen de la proteína UL37 del CaHV-1 mediante una herramienta molecular que cumple con las características del diagnóstico actual: rápido, sensible, específico y de bajo costo.

Lo anterior, sin duda, permitirá contribuir para resolver un problema existente en los planteles reproductores caninos, al tener la posibilidad de ofrecer la detección del CaHV1 en pequeños animales como mascotas de compañía, un área de sostenido crecimiento.

## SUMMARY

In Chile, the canine herpes virus (CaHV-1) has been detected by means of classic techniques of virology, like isolation in cell cultures and later cytolysis of the affected cells by means of immunofluorescence, by the presence of inclusion bodies or by means of studies of viral kinetic, which has allowed to complete the biological analysis of national isolated denominated RP5. In contrast, in the present work, the molecular detection of gene UL37 of CaHV-1, gene that was codified for the protein UL37. Which is present in the tegument of the virus and it participates in the replicated viral cycle. For such effect, 6 inocular virals were obtained from cellular cultures from the MDCK line infected with RP5 which were used at different times. For the PCR, the primers CHV-1: 5'-AAG AGCTCGTGTTAGTGAAAAT 3' and CHV-2: 5'-TAAACCCGCTGGATGATA C- 3' were used. (Erles *et al.*; 2004).

The amplicon visualization was realized by means electrophoresis in gel of agarosa to 2%. The electrophoresis was carried out to 90 volts for 90 minutes. As marking of molecular size, a standard was used that contained DNA fragments between 100 and 1000 pb. After the electrophoresis, the gel was put was under emersion in bromide of etidio (0.5 µg/mL), later washed, placed in a transluminator of ultra violet light and finally photographed. All of the supernatant of used cell cultures were positive to the described PCR, being observed, a band of around 500 bp, which concurs with what was described in the literature when using this methodology.

In order to have an approach of the sensitivity of the used technique, delusions were realized to the tenth ( $10^{-1}$ - $10^{-8}$ ) of the inoculate viral RP5 ( $TCID_{50} = 1.58 \times 10^6/ml$ ) and the dilution was determined to which the described PCR would not detect the protein gene UL37. Thus, 7 of the 8 dilutions were positive to the PCR, being observed a band of around 500 bp. The previous experiment indicates that this method would allow the detection of 0.00079  $TCID_{50}$  compared with 100 $TCID_{50}$  that in theory is required to cause cytolitic effects in the 100 percent of the inoculated cultures, suggesting a high sensitivity associated to the PCR.

The amplified product was sequenced and was determined that a 94 percent of nucleotide identity between the official sequence of the gene UL37 of canine viral herpes (GenBank accession number AY582738) and the sequence of consensus of the national amplified, which allows to conclude that the described methodology allows the

detection of amplicon of DNA with compatible characteristics with the described for the gene of the protein UL37 of CaHV-1.

Thus, we conclude that this methodology allows the detection of a DNA amplicon with characteristics consistent with those described for the UL37 protein gene of CaHV-1 by a molecular tool that meets the characteristics of current diagnosis: rapid, sensitive, specific and low cost.

This undoubtedly will help to solve a problem that exists in the canine breeding places, offering a possible detection of CaHV1 in small animals as pets for companionship, an area of sustained growth.

<b>INDICE DE CONTENIDOS</b>		<b>Página</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>2</b>
	<b>2.1</b> Historia	<b>2</b>
	<b>2.2</b> Clasificación taxonómica	<b>3</b>
	<b>2.3</b> Características fisicoquímicas	<b>5</b>
	<b>2.4</b> Características biológicas	<b>5</b>
	<b>2.5</b> Hospedadores	<b>6</b>
	<b>2.6</b> Vías de infección	<b>6</b>
	<b>2.7</b> Signología clínica	<b>6</b>
	<b>2.7.1</b> Enfermedad en Cachorros	<b>7</b>
	<b>2.7.2</b> Enfermedad genital en adultos	<b>8</b>
	<b>2.7.3</b> Problemas reproductivos	<b>8</b>
	<b>2.7.4</b> Signología respiratoria	<b>8</b>
	<b>2.7.5</b> Prevención	<b>9</b>
	<b>2.7.5.1. Vacunación</b>	<b>11</b>
	<b>2.8</b> Ciclo viral	<b>11</b>
	<b>2.9</b> La proteína UL 37	<b>12</b>
	<b>2.10</b> Métodos diagnósticos	<b>13</b>
	<b>3.0</b> Técnicas de biología molecular para la detección y estudio	<b>14</b>
	<b>3.1</b> Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)	<b>14</b>
	<b>3.2</b> Visualización del producto amplificado. Electroforesis en gel	<b>16</b>
	<b>3.3</b> Secuenciación	<b>16</b>
	<b>3.4</b> GenBank	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>SITUACION NACIONAL DEL VIRUS HERPES CANINO</b>	<b>17</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
	<b>5.1</b> Objetivo General	<b>19</b>
	<b>5.2</b> Objetivos Específicos	<b>19</b>

<b>6</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>		
	<b>6.1</b>	<b>Reactivación del Aislado Viral RP5</b>	<b>20</b>
		<b>6.1.1</b> Virus	<b>20</b>
		<b>6.1.2</b> Cultivos Celulares	<b>20</b>
		<b>6.1.3</b> Inoculación Viral	<b>20</b>
	<b>6.2</b>	<b>Detección del gen de la proteína UL37 en CaHV-1 mediante PCR convencional</b>	<b>20</b>
		<b>6.2.1</b> Obtención del ADN viral	<b>20</b>
		<b>6.2.2</b> PCR convencional	<b>21</b>
		<b>6.2.2.1</b> <i>Partidores</i>	<b>21</b>
		<b>6.2.2.2.</b> <i>Mezcla de Reacción</i>	<b>21</b>
		<b>6.2.2.3.</b> <i>Amplificación Del ADN.</i>	<b>21</b>
	<b>6.3</b>	<b>Visualización de Producto Amplificado por PCR</b>	<b>21</b>
	<b>6.4</b>	<b>Medidas de Bioseguridad</b>	<b>22</b>
	<b>6.5</b>	<b>Identificación del ADN amplificado por PCR</b>	<b>22</b>
		<b>6.5.1</b> Purificación	<b>23</b>
		<b>6.5.2</b> Secuenciación	<b>23</b>
		<b>6.5.3</b> Análisis	<b>23</b>
<b>7</b>	<b>Resultados</b>		<b>24</b>
	<b>7.1</b>	<b>Implementación PCR convencional para la detección de CaHV-1</b>	<b>24</b>
	<b>7.2</b>	<b>Determinación viral mínima detectable por la prueba de PCR</b>	<b>25</b>
	<b>7.3</b>	<b>Secuenciación. Determinación de identidad nucleotídica</b>	<b>26</b>
<b>8</b>	<b>DISCUSIÓN</b>		<b>28</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSIONES</b>		<b>32</b>
<b>10</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		<b>33</b>
<b>11</b>	<b>ANEXOS</b>		<b>38</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

Los animales están expuestos constantemente a distintos agentes biológicos causantes de enfermedad. Entre estos agentes se encuentran los virus, que poseen un mecanismo de acción y de generación de progenie totalmente distinto al de todos los otros agentes biológicos conocidos.

Un virus (de la palabra latina *virus*: [toxina](#) o [veneno](#)) es un agente biológico que para generar progenie necesita de una [célula](#) hospedadora. El ciclo vital de un virus siempre necesita de la maquinaria metabólica de la célula invadida para poder replicar su material genético, produciendo muchas copias del virus original. En dicho proceso algunos virus exhiben una capacidad especial: la de producir el efecto citopático de lisis celular, es decir, la muerte de la célula infectada.

Entre los virus que poseen la característica mencionada se encuentran los de la familia *Herpesviridae*, capaces de infectar a varias especies animales: humanos, caninos, bovinos, caprinos, equinos, etc. En la especie canina el virus herpes produce grandes perjuicios, con mayor impacto en individuos jóvenes, traduciéndose muchas veces en pérdidas que involucran tanto un alto valor económico como también afectivo.

En Chile, el virus herpes canino se asocia a una gran cantidad de cuadros clínicos, en especial en cachorros menores de cuatro semanas, cuya característica es una enfermedad hemorrágica. Si bien su detección y caracterización biológica fue descrita hace algunos años, lamentablemente aun no existe un método diagnóstico rápido, con lo cual permanece la interrogante sobre la real prevalencia del virus en Chile y sus efectos, en especial en lugares de hacinamiento canino como criaderos, albergues o cualquier otro sitio de alta densidad canina.

La implementación a futuro de una técnica diagnóstica para virus herpes canino sería de gran importancia en el área reproductiva canina, siendo un parámetro válido a evaluar en la elección de reproductores, dado que la infección solamente produce lesiones autolimitadas y de difícil diagnóstico.

Debido a lo anteriormente expuesto, en esta Memoria de Título se implementó la detección del gen de la proteína UL37, proteína presente en el tegumento viral, como una alternativa complementaria o confirmatoria a una técnica virológica clásica: el aislamiento viral.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Historia**

El virus herpes canino tipo 1 (CaHV-1) fue descrito por primera vez en 1965 por tres diferentes grupos de científicos (Ronsse *et al.*, 2003) y ha sido considerado durante muchos años como un agente clínico poco frecuente.

Si bien a mediados de la década del 60, fue descrito como un virus que en perros adultos provoca infecciones de la mucosa externa del aparato urogenital, formando parte del complejo de agentes patógenos involucrados en la llamada “tos de las perreras”, también fue asociado a una enfermedad hemorrágica mortal en cachorros menores de 4 semanas (Carmichael *et al.*, 1965).

En los años siguientes, se iniciaron estudios para conocer su verdadera patogenicidad, realizándose la primera infección experimental en perros libres de patógenos de 5 a 12 semanas de edad. Además, se realizó el primer trabajo con la finalidad de conocer su genoma, comparando su tamaño con el de otros 3 virus herpes. Paralelamente, se realizó el primer aislamiento viral en el tracto reproductivo de hembras caninas con problemas reproductivos (Appel *et al.*, 1969, Poste y King, 1971).

Los primeros trabajos de investigación se realizaron para determinar la presencia de anticuerpos contra CaHV-1 se hicieron en Estados Unidos en el año 1969, encontrándose seroprevalencias de 12% (Ronsse *et al.*, 2003)

Actualmente, la presencia del virus es mundial y estudios recientes sugieren una alta seroprevalencia en la población canina (Ronsse *et al.*, 2003). El virus ha sido aislado en numerosos países y estudios recientes en Europa sugieren que es un agente enzoótico en la población de perros domésticos (Lacheretz y Cognard, 1998).

Recientes estudios serológicos indican un alto nivel de infección en la población canina y en general, se estima que más del 40% de los perros de Europa tuvieron contacto con el virus (Buonavoglia y Martella., 2007). En un estudio realizado en EE.UU investigaron la enfermedad respiratoria canina, encontrando que en un 6% de los perros había una importante cantidad anticuerpos contra CaHV-1, durante la fase clínica de la enfermedad (Morresey, 2004). La prevalencia de anticuerpos varía entre los diferentes países en rangos que van desde el 9 al 88% (Buonavoglia y Martella 2007).

A finales de la década de los setenta se realizó el primer estudio para lograr una vacuna contra CaHV-1, pero no fue hasta la década de los noventa que se elaboró una vacuna experimental a virus inactivado, desarrollada a partir de la cepa F205 (Carmichael y Greene., 1998). La vacuna desarrollada fue probada exitosamente en el año 2001, donde seis perras libres de CaHV-1 se vacunaron contra el virus diez días después de la monta. A los 3 días del parto todos los cachorros expuestos al virus sobrevivieron, a diferencia de un grupo control (Poulet *et al.*, 2001).

## 2.2. Clasificación taxonómica

Según una reciente publicación del International Committee of Taxonomy of Viruses (ICTV) el CaHV-1 es un virus perteneciente al orden *Herpesvirales*, familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus*. El Orden *Herpesvirales* incluye, además, otros virus herpes que infectan a hospederos tan diversos como mamíferos, reptiles y aves, pertenecientes a otras dos familias: *Alloherpesviridae*, que infectan a los peces y anfibios, y *Malacoherpesviridae*, con un único miembro que infectan moluscos bivalvos de invertebrados (Davison *et al.*, 2009).

La familia *Herpesviridae* incluye 3 subfamilias ya aceptadas: *Alphaherpesviridae*, *Betaherpesviridae* y *Gamaherpesviridae*, existiendo una subfamilia aun sin clasificar y virus herpes sin clasificar aun. Así, se han descrito más de 130 especies distintas de herpesvirus que cuentan con una impresionante gama de especies afectadas (Cuadro 1).

A pesar de presentar diferencias, los virus de la familia *Herpesviridae* comparten algunas propiedades biológicas, lo que ha permitido su clasificación en las tres subfamilias mencionadas y las propiedades biológicas compartidas son:

1. Todos codifican para enzimas involucradas en el metabolismo del ácido nucleico, síntesis de ADN y posiblemente procesamiento de proteínas. Sin embargo, el número de las proteínas codificadas por cada virus varía.
2. En el núcleo se sintetiza el ADN y se ensamblan las cápsides y la envoltura se adquiere al atravesar la membrana nuclear.
3. La infección productiva siempre conlleva a la destrucción de la célula infectada.
4. Todos los virus herpes establecen infecciones latentes en su hospedero natural.

**Cuadro 1.** Herpesvirus causantes de enfermedad en animales

<b>Subfamilia <i>Alphaherpesvirinae</i></b>	
Herpesvirus bovino tipo 1	Rinotraqueitis infecciosa bovina, vulvovaginitis infecciosa, balanopostitis infecciosa, aborto
Herpesvirus bovino tipo 2	Enfermedad de pseudo-lumpyskin
Herpesvirus bovino tipo 5	Encefalitis
Herpesvirus caprino 1	Conjuntivitis. Enfermedad entérica y respiratoria
Herpesvirus porcino 1	Pseudorabia porcina
Herpesvirus equino 1	Aborto, mortalidad perinatal , enfermedades respiratorias, enfermedad neurológica
Herpesvirus equino 3	Exantema coital
Herpesvirus equino 4	Rinoneumonitis
Herpesvirus canino1	Enfermedad hemorrágica en cachorros
Herpesvirus felino 1	Rinotraqueitis viral felina
B virus (Cercopithecine herpesvirus 1)	Herpesvirus simplex enfermedad del macaco , fatal en humanos
Varicellavirus simio	Varicela en monos
Herpesvirus gallináceo 1	Laringotraqueitis en pollos
Herpesvirus gallináceo 2	Enfermedad de Mareck
Herpesvirus Anatidos	Plaga de los patos
<b>Subfamilia <i>Betaherpesvirinae</i></b>	
Herpesvirus porcino 2	Rinitis con cuerpos de inclusión
<b>Subfamilia <i>Gammaherpesvirinae</i></b>	
Herpesvirus Alcelaphine 1	Fiebre catarral maligna
Herpesvirus equino 2	Infección equina gammaherpesvirus
Herpesvirus equino 5	Infección equina gammaherpesvirus
<b>Familia sin clasificar Herpesvirus del bagre</b>	
Herpesvirus ictalurido	Enfermedad sistémica del bagre
<b>Herpesvirus sin clasificar</b>	
Herpesvirus salmonideo 1 y 2	Enfermedad sistémica

(Adaptado de Murphy *et al.*, 2003)

Tanto el CaHV-1 como algunos de los virus herpes que afectan a humanos pertenecen a la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, que incluyen cepas virales capaces de realizar ciclos líticos cortos en las células que infectan, de propagación rápida, con un amplio rango de hospedadores y capaces de producir infecciones latentes, principalmente en los tejidos nerviosos (Boehmer y Lehman, 1997).

### **2.3 Características Fisicoquímicas**

Estos virus poseen un genoma compuesto por ADN bicatenario, lineal y una cápside de simetría icosaédrica constituida por 162 capsómeros. El diámetro del virión es de 180 a 200 nm. Rodeando la cápside se encuentra el tegumento, una matriz amorfa que contiene numerosas proteínas con actividad enzimática (Boehmer y Lehman, 1997). La longitud del genoma total es de 128 kilobases (Remond *et al.*, 1996). Posee un bajo porcentaje de guanina y citosina (33%), una característica típica del virus CaHV-1 (Plummer *et al.*, 1969).

### **2.4. Características Biológicas.**

La presencia de una envoltura constituida por glicoproteínas y lipoproteínas confiere al virión una alta sensibilidad ante solventes lipídicos (cloroformo) y desinfectantes comunes (cloramina, formaldehído, derivados fenólicos, amonio cuaternario, etc.). Posee una “vida media” de 5 horas a 37°C. Es inestable tanto en condiciones de acidez (pH <5) como también de alcalinidad (pH >8). Su temperatura óptima de multiplicación es de 32-33°C, con disminución del rendimiento viral a los 36°C y es inactivado a temperaturas sobre 40°C. Su capacidad infectante comienza a disminuir luego de 24 horas a 4°C (Carmichael *et al.*, 1998).

El CaHV-1 comparativamente con otros *Alphaherpesvirus* posee un estrecho rango de células hospedadoras. Solo se multiplica en cultivos primarios de células de origen canino tales como riñón y testículo o líneas celulares como la Madin Darby Canine Kidney (MDCK). En estas líneas celulares el virus produce efecto citopático (ECP) caracterizado por la presencia de focos líticos, redondeamiento de las células infectadas con aumento de la refringencia, formación de sincicios y posteriormente un desprendimiento total de la monocapa (Kim *et al.*, 2005; Love y Hurxtable, 1976; Murphy *et al.*, 1999).

Otra característica importante de los virus herpes es su capacidad de entrar en estado de latencia, es decir, es un estado en que no se produce progenie viral, lo que se produce fundamentalmente en ganglios nerviosos (Boehmer y Lehman, 1997).

## **2.5. Hospedadores**

Si bien el CaHV-1 afecta a perros domésticos, tanto cachorros como adultos, un virus similar al CaHV-1 fue aislado de cachorros de coyote en cautiverio (Robinson *et al.*, 2005; Buonavoglia y Martella., 2007). Por otra parte, se ha descrito la detección de anticuerpos en nutrias de río (*Londra canadensis*) en América del Norte como también en zorros rojos (Ronsse *et al.*, 2003).

## **2.6. Vías de Infección**

La principal vía de transmisión es el contacto directo. Los adultos se infectan por contacto oronasal o venéreo (Poste y King, 1971). En general, en los perros infectados mayores de 1-2 semanas de edad al momento de la exposición, la enfermedad se presenta asintomática.

En los cachorros recién nacidos, la enfermedad es generalmente fatal, debido a que carecen de inmunidad recibida de sus madres. Los cachorros recién nacidos pueden adquirir la enfermedad al nacimiento por las secreciones vaginales, al pasar por canal del parto o bien en el post-parto por contacto con secreciones oronasales de la madre (lágrimas, saliva, lamidos) o de otros perros en un criadero (esputo, orina, heces, vómitos). Los hermanos de camadas infectadas o los perros vecinos que eliminan al virus, también cumplen el rol de fuente de infección (Poulet y Dubourget, 1993; Carmichael y Greene, 1998).

## **2.7 Signología Clínica**

En perros adultos, el virus sólo causa una infección leve del tracto respiratorio superior o genital (Hill y Maré, 1974). Sin embargo, en la perra gestante la infección puede inducir muerte fetal, aborto y mortalidad entre las crías (Hashimoto *et al.*, 1982).

Una característica notable de todos los *Alphaherpesvirus* es la capacidad de inducir una infección latente en el nervio trigémino y en ganglios de múltiples tejidos (Burr *et al.*, 1996). Los animales que sobreviven a la infección permanecen como portadores asintomáticos de por vida. La mayoría de las infecciones en adultos son subclínicas (Carmichael, 1970; Hashimoto y Hirai, 1986).

Esta enfermedad es raramente diagnosticada durante la vida del animal. Los hallazgos postmortem, particularmente lesiones equimóticas hemorrágicas en riñón y tracto gastrointestinal son característicos, al igual que los cuerpos de inclusión presentes en células hepáticas (Murphy *et al.*, 1999).

### 2.7.1 Enfermedad en cachorros

La muerte de los cachorros de 1 a 4 semanas de edad es común. Los cachorros raramente mueren si tienen 2 - 3 semanas de vida en el momento de la exposición. La duración de la enfermedad en los cachorros recién nacidos es de 1 a 3 días. Los signos consisten en anorexia, disnea, dolor a la palpación abdominal, incoordinación y, a menudo, heces blandas amarillo verdosas. Puede haber una descarga nasal serosa, o hemorrágica. Las petequias son frecuentes en las membranas mucosas. La temperatura rectal no está elevada. Se ha reportado trombocitopenia en cachorros moribundos (Carmichael, 1998). Por lo general, los cachorros mueren entre 24 y 48 horas después de la aparición de los síntomas y con frecuencia la infección es tan aguda que se presentan signos neurológicos como ceguera, ataxia cerebelosa y signos vestibulares que persisten de por vida (Huxsoll y Hemelt, 1970). Los cachorros expuestos al virus herpes canino, ya sea en el útero, durante el parto o dentro de las 2 primeras semanas de vida pueden desarrollar una meningoencefalitis que puede afectar preferentemente el cerebelo y casi todos los cachorros con una infección activa temprana en la vida sucumben a la infección.

#### Signos clínicos:

Decaimiento	Petequias, hemorragia en la mucosa oral y genital	Trastorno digestivo
Salivación	Dolor abdominal y signos de dolor a la palpación	Anorexia
Panuveítis	Secreción nasal muco- purulenta y hemorrágica	Hipotermia
Vómitos	Heces blandas de color gris amarillento	Pápulas
Disnea	Trastornos respiratorios: estornudos	Edema subcutáneo
Conjuntivitis	Signos neurológicos: ataxia, opistótonos	Cataratas
Retinitis	Trastornos oculares: displasia de la retina.	

(Ronsse *et al.*, 2003)

Sin embargo, algunos cachorros sobreviven y presentan lesiones residuales en el SNC. Estos cachorros pueden verse afectados con una displasia de retina, ya que este tejido está experimentando una diferenciación activa en el momento de la infección, lo que afectaría su conformación (Curtis y Dewey, 2003).

### **2.7.2 Enfermedad genital en adultos**

La forma genital de la enfermedad en las hembras se caracteriza por hiperemia vaginal e hiperplasia linfoide. La aparición ocasional de pápulas o lesiones vesiculares en la mucosa genital evolucionan en 15 a 30 días con ulceración, pudiendo regresar en el proestro siguiente presentándose hiperplasia de las glándulas de la submucosa. En los machos provoca pápulas en el pene. Las lesiones observadas en vagina, pene y prepucio son generalmente autolimitadas (Gallosi, 2007).

### **2.7.3 Problemas reproductivos**

Los signos clínicos en los cachorros dependen de la edad, presencia de anticuerpos maternos, estrés e infecciones concurrentes (Hashimoto y Hirai, 1986; Kraft *et al.*, 1986). Si la infección se produce durante la preñez, ocurren abortos o muerte perinatal súbita en las primeras 48 horas del nacimiento. La muerte fetal, momificación, abortos, nacimientos prematuros o anormales, podrían asociarse a la infección prenatal (Hashimoto, 1986). Las hembras que paren camadas infectadas desarrollan inmunidad para el siguiente celo y salvo raras excepciones, las camadas posteriores son normales (Hirai *et al.*, 1978).

### **2.7.4. Signología respiratoria**

Se describe la participación de virus herpes caninos en la traqueobronquitis infecciosa canina (TIC), conocida también como la “tos de las perreras” que es una enfermedad infectocontagiosa que se observa frecuentemente en lugares donde existe gran concentración de animales como criaderos, centros de adiestramiento y residencias caninas (Buonavoglia y Martella., 2007; Erles *et al.*, 2004 ).

Esta infección es causada por varios otros agentes etiológicos que pueden actuar aisladamente o por asociación entre ellos: *Bordetella bronchiséptica*, *Mycoplasma sp*, Adenovirus canino tipo 2 (AVC-2), *Paramyxovirus* tipo 2 (Appel y Bemis, 1978; Mccandlish *et al.*, 1978; Erles y Brownlie, 2005). El CaHV-1 participa en la TIC, es decir, su importancia como agente etiológico en esta signología clínica no está del todo

determinado (Erles *et al.*, 2004). El cuadro inicial puede mantenerse durante meses presentando problemas en el sistema respiratorio (Bemis *et al.*, 1977; Ueland, 2003).

La TIC se trasmite por contacto directo y por vía aerógena a través de las microgotas producidas en los accesos de tos o estornudos. La falta de ventilación, la exposición a aerosoles, el frío, el stress y otros factores ambientales pueden ser predisponentes ya que todos ellos pueden deteriorar la barrera mucociliar que sirve de defensa al sistema respiratorio (Carmichael, 1970).

Los signos más frecuentemente observados son: fiebre, tos seca, ronca y paroxística que puede tornarse productiva. La tos ronca o “ladrido de foca”, se produce por la inflamación de las cuerdas vocales. Existe una moderada expectoración al final de la misma, que hace que pueda confundirse con la presencia de un cuerpo extraño en las vías respiratorias superiores. Además, se observan arcadas y vómitos de flema, descarga nasal serosa y linfadenopatías.

La enfermedad es autolimitante y se resuelve en 1-2 semanas. Si surgen complicaciones (generalmente en las razas pequeñas, en perros de edad avanzada o inmunosuprimidos) los animales pierden el apetito, disminuyen de peso, aparecen las complicaciones bacterianas que conducen a bronconeumonía y puede producirse la muerte (Ueland, 2003).

### **2.7.5 Prevención**

La prevención consiste en proporcionar calor a las crías por todos los medios posibles (incubadora, bolsa de agua caliente, manta eléctrica, lámpara infrarroja, etc.) para mantener su temperatura rectal por encima de los 37°C.

El Médico Veterinario puede indicar una sueroterapia desde el nacimiento, con suero proveniente de madres inmunizadas que hayan perdido recientemente su camada. Se recomienda mantener la temperatura del cachorro por sobre los 37° C, para así evitar que el cachorro pierda contacto con la madre, pues si su temperatura es demasiado baja (<35°C) la madre generalmente rechaza a la cría apartándola de camada, con la consiguiente incapacidad para mamar.

Por ello, es recomendable mantener las primeras semanas a los cachorros con fuentes de calor externo, controlando la temperatura en las semanas siguientes cuando el cachorro es ya capaz de termoregular de mejor manera (Lacheretz, 1987) (Figura 1).

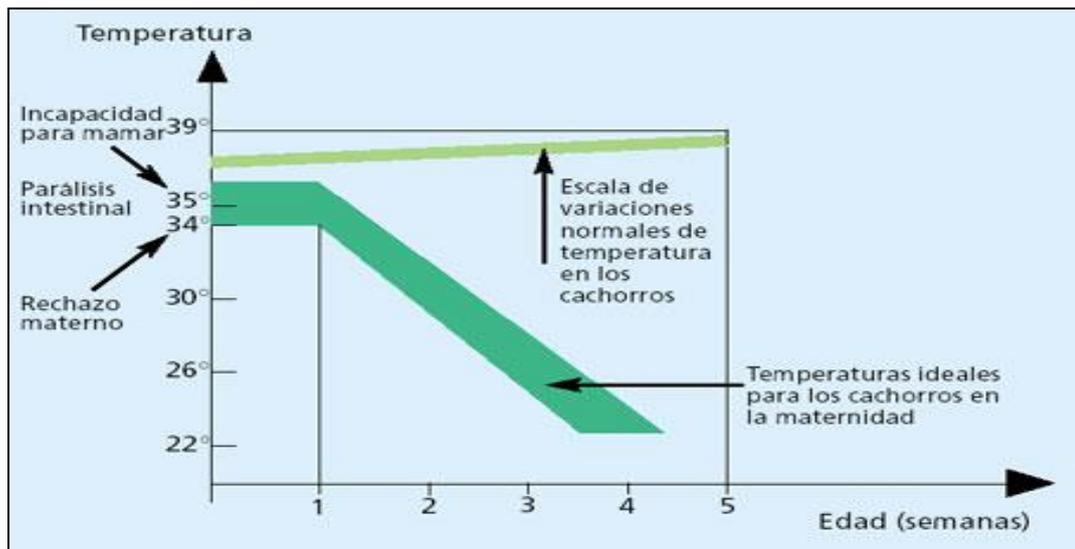


Figura 1: Recomendaciones de temperatura en caso de infección por herpesvirus canino (Lacheretz, 1987).

El CaHV-1 es poco resistente en el medio externo y, por lo tanto, la mayoría de los desinfectantes lo destruyen eficazmente (hipoclorito de sodio, formol, sales de amonio cuaternario). Además, es muy sensible al calor ( $>37^{\circ}\text{C}$ ), pero muy resistente al frío.

Los animales portadores del virus deben ser separados de los demás para evitar todo contacto directo de mucosa a mucosa (genital o respiratoria) con animales sanos (Gallosi, 2007).

Una método de prevención utilizado por criadores consiste en evitar que el virus entre al criadero, poniendo en cuarentena a los animales recientemente ingresados y realizando dos controles serológicos durante este período, con intervalos de tres semanas. A menudo, la contaminación del criadero se produce como consecuencia de apareamientos o inseminaciones practicadas fuera del criadero con reproductores "portadores asintomáticos" no controlados. Por consiguiente, es aconsejable comprobar que los genitales externos de los reproductores no presentan lesiones (pápulas), limpiarlos con un antiséptico antes del apareamiento y pedir sistemáticamente un control serológico de los reproductores antes de cada apareamiento o inseminación (a pesar de que, si el animal no está inmunodeprimido, el resultado puede ser negativo aunque sea portador) (Lacheretz *et al.*, 1987).

### 2.7.5.1 Vacunación

La vacunación de la perra al momento del celo y alrededor de cincuenta días después del apareamiento podría conferir protección contra la forma neonatal aguda (Thébault, 2004).

Para contrarrestar la infección por virus herpes canino, se utiliza una profilaxis médica utilizando la vacuna inactivada EURICAN Herpes205 ® (Laboratorio Merial), vacuna que ha sido creado específicamente en el centro canino Bizerta España. Su eficacia se evaluó en hembras gestantes mediante la medición la tasa de muerte fetal de los cachorros, así como el análisis de lesiones patológicas observadas en los cachorros (Chabchoub *et al.*, 2006).

Para una protección óptima, el protocolo de vacunación que describe efectividad de la vacuna sobre el herpes virus en perras gestantes considera 2 inyecciones: al inicio y al final de la gestación para optimizar la respuesta de anticuerpos neutralizantes antes del parto y su concentración en el calostro. Así, el uso de la vacuna EURICAN ® 205 contra el CaHV-1 durante la gestación tiene como resultado una reducción significativa de la mortalidad de las crías antes del destete. El uso de esta vacuna ofrece una alternativa de prevención neonatal contra CaHV-1; sin embargo no puede evitar su transferencia entre adultos y cachorros (Chabchoub *et al.*2006).

## 2.8. Ciclo viral

**Replicación viral.** La replicación se inicia con la interacción de las glicoproteínas virales con los receptores celulares originando la fusión de la envoltura del virus con la membrana plasmática. De esta manera, la nucleocápside penetra al citoplasma celular hasta finalmente llegar al núcleo, donde se lleva a cabo la transcripción y replicación del virus. En estos procesos participan las enzimas y factores de transcripción que se encuentran en el tegumento viral (Boehmer y Lehman, 1997).

Los genes del CaHV-1 se clasifican en pre-tempranos, tempranos y tardíos. La transcripción del genoma y la síntesis de proteínas virales se realizan en forma secuencial en tres fases reguladas en gran parte por proteínas virales. En la primera fase se expresan los genes pre-tempranos ( $\alpha$ ) y la función de las proteínas pre-tempranas es unirse al ADN para regular la transcripción del resto del genoma. En la segunda fase, se expresan los genes tempranos ( $\beta$ ) que codifican proteínas virales involucradas en la síntesis de ADN, entre ellas la polimerasa viral y factores de transcripción. Finalmente,

en la tercera fase se sintetizan las proteínas tardías ( $\gamma$ ), que son principalmente de tipo estructural (Boehmer y Lehman, 1997).

En la transcripción del genoma viral intervienen transcriptasas celulares, pero su regulación está mediada tanto por factores de transcripción codificados por el virus y como por la célula. La respuesta lítica o latente también está regulada por factores de transcripción y genes celulares. En la respuesta latente, se transcriben únicamente los genes pre-tempranos. En cambio, para tener una respuesta lítica se requiere la expresión de genes de las tres fases diferentes. El genoma de los virus de herpes tiene capacidad para codificar de 40 a 80 proteínas, aunque algunas de ellas no se expresan en cultivos celulares y están involucradas en el transporte del virus en el organismo (Boehmer y Lehman, 1997).

Como se ha descrito, un virus herpes consta de cuatro estructuras morfológicamente distintas; un genoma compuesto de ADN, la cápside, el tegumento y la envoltura. El tegumento ocupa el espacio entre la nucleocápside (cápside + genoma ADN) y la envoltura.

Si bien el tegumento se ha descrito previamente como una masa o zona amorfa, la creciente evidencia sugiere que existe un orden específico que toma forma durante la replicación viral, pues las funciones que desempeña el tegumento durante la replicación del herpes viral incluyen: el transporte de la cápside durante la entrada al núcleo y salida desde la célula; la focalización de la cápside hacia el núcleo celular, la regulación de la transcripción, traducción y apoptosis celular; de la replicación del ADN, del ensamblaje en el citoesqueleto y de la salida nuclear de la cápside viral.

El genoma del CaHV-1 se caracteriza por poseer dos regiones únicas, una región única larga (UL) y una región única corta, que corresponden al 84% y 16% del genoma viral respectivamente y que codificarían al menos 75 proteínas (Remond *et al*, 1996).

## **2.9 La proteína UL37**

Una combinación de análisis genéticos, bioquímicos y de proteínas de *Alphaherpesvirus* sugieren que el tegumento contiene alrededor de 20 proteínas virales, como por ejemplo; UL11, UL13, UL14, UL21, VP1-3, UL37, UL41, UL46, UL47, UL48, UL49, UL51, ICP0, ICP4, US3, US10 y US11. Estas proteínas se disponen interactuando unas con otras formando un intrincado complejo que une la cápside con los dominios intrategumento de las glicoproteínas de la envoltura (Mettenleiter, 2002).

Una de estas proteínas es la proteína UL37, una proteína conservada entre los integrantes de la familia *Herpesviridae*, de tipo tardía y descrita como una proteína esencial para la replicación viral, participando en el egreso de la cápside desde el núcleo celular y en la adquisición de la envoltura viral (Loret *et al.*, 2008).

El gen UL37 codifica un polipéptido de 120-kDa fosforilado que se expresa tarde en el ciclo de replicación del virus. En ensayos de inmunofluorescencia realizados en células infectadas con virus *Herpes Simplex* se ha descrito que el polipéptido UL37 se distribuye a lo largo de la célula infectada, predominantemente en el citoplasma (Schmitz *et al.*, 1995).

En detalle, las funciones de estas proteínas están relacionadas con:

- a) Regular la expresión de genes virales y de la célula hospedadora en las distintas etapas de la infección (Batterson y Rotzman, 1983)
- b) Participar en el transporte de la capsida a través de la célula (Sodeik *et al.*, 1997).
- c) Intervenir en la inserción del ADN viral en el núcleo celular (Batterson *et al.*, 1983)
- d) Contribuir al encapsulamiento del ADN viral de la progenie (Salmon *et al.*, 1998)
- e) Participar en la salida del virión de la célula huésped ( Desai, 2000)

Las proteínas VP1-3, UL37 y UL48 son imprescindibles para la morfogénesis de los viriones de virus herpes, mientras que otras pueden faltar sin afectar mayormente la estructura de virion (Desai, 2000). Así, se ha observado que la proteína UL37 del herpesvirus interacciona con VP1-3 pudiendo llegar a constituir una segunda capa de recubrimiento de la cápside en el tegumento del virión (Klupp *et al.*, 2002)

Se sugiere que el tegumento de los herpesvirus se construye en dos frentes distintos; uno en base a las proteínas UL36 y UL37 que interaccionan directamente con la nucleocápside y otro en la membrana que acabará formando la envoltura del virión (Wang *et al.*, 2001).

## 2.10 Métodos diagnósticos

En general, para el diagnóstico de los virus en el laboratorio se emplean 4 métodos de detección:

- (1) **Por su morfología.** Para visualizar la morfología viral, la suspensión viral extraída de un tejido y purificada de contaminantes celulares y concentrada, es teñida y observada en microscopio electrónico.

- (2) **Por su efecto en células.** Para verificar alteraciones de estructuras celulares provocadas por la multiplicación viral, la muestra es fijada en formaldehído y luego mediante cortes histológicos es observada en microscopio óptico.
- (3) **Por sus antígenos.** Para detectar la presencia de antígenos vírales en la muestra, se pueden emplear anticuerpos específicos contra el virus, marcados con fluoresceína y observar la emisión de luz fluorescente en un microscopio de fluorescencia o color.
- (4) **Por su genoma.** En el caso particular de la detección por su genoma, ésta se puede realizar por detección total del genoma viral o por detección de una zona particular del genoma. La zona del genoma que posee la secuencia nucleotídica específica para el virus se puede amplificar por PCR, utilizando como partidores una secuencia nucleotídica complementaria. Posteriormente, se visualiza el fragmento amplificado en geles de agarosa mediante aplicación de luz UV. Esta técnica se recomienda para detección de virus que se encuentran en muy baja cantidad en la muestra (Celedón *et al.*, 2000).

### **3. Técnicas de biología molecular para la detección y estudio**

#### **3.1 La Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)**

A inicios de la década de los ochenta el bioquímico Kary Mullis desarrolló un método para la amplificación del ADN, denominado reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Esta técnica se ha utilizado en múltiples campos de la investigación, incluyendo genética, medicina forense, biología evolutiva y para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, donde el potencial del PCR para amplificar mínimas cantidades de ADN diana ha sido particularmente atractivo (Murphy *et al.*, 1999).

Según el autor de la técnica: *“La reacción es fácil de hacer, no requiere más que un tubo de pruebas, unos pocos reactivos simples y una fuente de calor”* (Mullis, 1990). Este investigador fue galardonado con el Premio Nobel de Química en 1993 por su invaluable aporte a la Medicina Molecular.

El PCR es una técnica de gran utilidad en el estudio molecular de los virus. En forma simple, la técnica consiste en obtener múltiples copias de una zona del genoma, a través de síntesis secuenciales de nuevas hebras de ADN de dicha región, por la acción de una polimerasa termoestable (Sambrook y Russel, 2001)

Para realizar la técnica se necesitan:

- Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), el sustrato para polimerizar nuevo ADN.
- Dos cebadores (o *primers*), oligonucleótidos complementarios a cada una de las dos hebras del ADN. Son secuencias cortas, normalmente entre 18 y 22 nucleótidos, que son reconocidos por la polimerasa permitiendo iniciar la reacción. Delimitan la zona de ADN a amplificar.
- Iones divalentes. Se suele usar magnesio ( $Mg^{+2}$ ), agregado comúnmente como cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), o algún otro catión divalente. También se puede emplear manganeso ( $Mn^{+2}$ ) para mutagénesis de ADN mediante PCR, ya que altas concentraciones de  $Mn^{+2}$  incrementan la tasa de error durante la síntesis de ADN. Actúan como cofactores de la polimerasa.
- Iones monovalentes, como el potasio.
- Una solución tampón (buffer) que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa
- ADN polimerasa o mezcla de distintas polimerasas con temperatura óptima alrededor de 70 °C (la más común es la Taq polimerasa).
- ADN molde, que contiene la región de ADN que se va a amplificar.
- Termociclador, el equipo que va a mantener la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo (Sambrook, 2001).

En forma simple, la técnica consiste en múltiples ciclos de amplificación, cada uno de ellos consistentes en tres pasos:

- Desnaturación de ADN de cadena doble (90-94°C)
- Alineación de los partidores a las cadenas simples de ADN (37°C – 60°C)
- Elongación o extensión de los partidores (68-72°C)

Cada ciclo de amplificación lleva a duplicar la cantidad de ADN inicial. Esto hace que esta técnica tenga una gran sensibilidad analítica (capacidad de detectar la menor cantidad posible de ADN) y una gran especificidad (dada por la especificidad de los partidores utilizados) (Celedón *et al.*, 2000).

### 3.2. Visualización del Producto Amplificado. Electroforesis en gel.

Después de la amplificación, los productos son visualizados utilizando la técnica de electroforesis, que consiste en la separación de las moléculas de ADN gracias a su carga eléctrica negativa y tamaño molecular. Los fragmentos de ADN son separados en gel de poliacrilamida o agarosa inmersos en una solución buffer, sometido a un campo eléctrico. La concentración del gel determina la capacidad de resolución de los fragmentos de ADN. Así, mientras menor el tamaño de los productos de la reacción, mas concentrado debe utilizarse el gel, de esta forma para PCR diagnóstico generalmente se utilizan concentraciones de agarosa al 2% (Danchin y Yuek, 2001; Pennington, 2002).

### 3.3 Secuenciación Nucleotídica

Es una técnica que permite determinar la secuencia o el orden de las bases nucleotídicas (A, C, G y T) en un ácido nucleico determinado.

Permite determinar el tipo de base nucleotídica para cada posición del genoma viral.

Ej:

				100									110							
5'	...	A	T	C	C	G	G	A	T	T	T	C	G	G	T	A	A	T	....	3'

Su utilidad se encuentra principalmente ligada al análisis genómico viral a través de (a) detección de genes virales, (b) detección de mutaciones, (c) comparación de secuencias nucleotídicas entre virus diferentes o entre variantes virales, (d) detección de regiones conservadas del genoma para síntesis de sondas o partidores, etc. (Celedón, 2000).

### 3.4 GenBank

El GenBank ® es la base de datos de secuencias genéticas del *National Institute of Health* (NIH), una colección de todas las secuencias de ADN conocidas a disposición del público. Hay aproximadamente 756.108.431.692 bases en 106.533.156 de secuencias conocidas en el GenBank tradicional y 148.165.117.763 bases en 48.443.067 registros secuencia en la división WGS (NCBI, 2010).

El GenBank es parte de *International Nucleotide Sequence Database Collaboration*, que está integrada por la base de datos de ADN de [Japón](#) (*ADN DataBank of Japan*

(DDBJ)). El [Laboratorio Europeo de Biología Molecular](#) (*European Molecular Biology Laboratory (EMBL)*) y el GenBank en el *National Center for Biotechnology Information* intercambian datos diariamente. GenBank y sus colaboradores reciben secuencias genéticas producidas en laboratorios de todo el mundo, procedentes de más de 100.000 organismos distintos. GenBank continúa creciendo a ritmo exponencial, doblando la cantidad de información contenida cada 10 meses (NCBI, 2010).

Las comunicaciones directas con GenBank se hacen utilizando BankIt, que es un formato basado en la Web, o el programa independiente Sequin. Tras la recepción de una secuencia, el personal de GenBank asigna un número de acceso a la secuencia y realiza controles de calidad. Luego, las presentaciones son publicadas en la base de datos pública, en donde las entradas son recuperables por [Entrez](#) (*Global Query Cross-Database Search System*), aplicación que permite acceder a la base de datos del [National Center for Biotechnology Information](#) (NCBI) o se puede descargar por [FTP](#) (**File Transfer Protocol**).

La mayoría de las presentaciones de Expressed Sequence Tag (EST), Sequence Tagged Site (STB), Genome Survey Sequence (SSG) y High-Throughput Genome Sequence (HTGS) son presentadas por los grandes centros de secuenciación. El grupo de presentaciones directas de GenBank también procesa las secuencias completas del genoma microbiano (NCBI, 2010).

#### **4. Situación nacional del Virus Herpes Canino**

A nivel nacional la enfermedad hemorrágica de los cachorros menores de 4 semanas y el virus asociado fueron sugeridos inicialmente en el año 1992, donde se utilizó una línea celular de riñón fetal equino para el estudio del virus en el laboratorio. Su presencia fue sugerida por la presentación de muerte perinatal en cachorros que evidenciaron la presencia de petequias en riñón e hígado y 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: lisis celular (Larenas *et al.*, 1992). Este artículo constituyó la primera información nacional documentada respecto de la presencia de CaHV-1 en Chile.

Posteriormente, se informó la detección del virus mediante la obtención de un aislado viral denominado RP5, que produce el efecto citopático característico de virus herpes:

lisis celular y que presenta alta reactividad en una prueba de inmunofluorescencia directa que utiliza un anticuerpo policlonal conjugado con isotiocianato de fluoresceína, dirigido contra glicoproteínas de la envoltura del CaHV-1 (Navarro *et al.*, 2003). Tiempo después se caracterizó su comportamiento biológico (Navarro *et al.*, 2005). Sin embargo, la caracterización genómica sigue pendiente. A nivel de clínicas veterinarias se sospecha la presencia del virus herpes canino solo a través de presunciones, sin registros, ni diagnóstico alguno. Se sospecha de una infección por CaHV-1 luego de haber descartado la presencia de otros causantes de infección, en especial los que impliquen pérdida de las crías en camadas enteras (De los Reyes, comunicación personal. Laboratorio de reproducción animal. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile). Con relación a este virus en los planteles reproductores, algunos criadores nacionales han informado tener poca información del virus y otros sospechan de su presencia. Sin embargo, no se dispone de ninguna fuente de información ni algún estudio anterior que determine la prevalencia del virus en nuestro país.

A nivel mundial, existen algunas referencias en la literatura respecto de detección de virus herpes canino mediante la identificación de los genes de la glicoproteína B mediante PCR convencional (Erles *et al.*, 2004) y Timidin Kinasa utilizando un PCR anidado (Schulze y Baumgartner, 1998), con resultados exitosos en la detección molecular de virus herpes. En Norteamérica y en Europa se comercializa un kit comercial denominado K093, con una sensibilidad mayor a 95% según recomendaciones del fabricante. Este kit de amplificación es fabricado por Genekam Biotechnology AG (Alemania) y es utilizado para detectar el virus herpes por PCR anidado. Este kit puede detectar virus herpes canino desde tejido nervioso, riñones, sangre, suero, plasma o cualquier otro fluido corporal. Este kit identifica un fragmento del gen de la Timidin Kinasa, sin embargo por secretos del fabricante no revela los partidores ni sección de gen a identificar (Genekam Biotechnology, 2010). Este kit aun no está disponible en Chile y no ha sido probado en aislados nacionales. Además, por su alto costo económico es necesario el intentar algunas alternativas de detección del virus herpes canino, como se propone en esta memoria de título, al utilizar la detección de un fragmento del gen de la proteína UL37 mediante PCR, contribuyendo así a la caracterización molecular del aislado RP5 como también a dar los primeros pasos en la implementación de un método diagnóstico de uso habitual.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Implementar la detección molecular del gen de la proteína UL37 del virus herpes canino mediante la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Detectar el gen de la proteína UL37 del virus herpes canino en el aislado RP5.
2. Determinar el porcentaje de identidad nucleotídica respecto de la base de datos genómica GenBank®

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS.**

Esta investigación se realizó en los laboratorios de Microbiología y Virología pertenecientes al Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y contó con financiamiento propio de los participantes.

### **6.1.- Reactivación del aislado viral RP5.**

**6.1.1 Virus.** El inóculo viral del aislado RP5 se encontraba congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  en dependencias de la Unidad de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

**6.1.2 Cultivos celulares.** Se utilizaron cultivos celulares de la línea MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), originaria de riñón canino, que se mantuvieron en frascos de cultivo a  $37^{\circ}\text{C}$  en medio esencial mínimo de Eagle (MEM), adicionado con antibióticos (penicilina (100U/ml), estreptomicina (100  $\mu\text{g/ml}$ )) y suplementado con 10% de suero fetal bovino.

**6.1.3 Inoculación viral.** Los cultivos celulares confluentes fueron inoculados con el aislado RP5 y mantenidos a temperatura de  $32-33^{\circ}\text{C}$ , temperatura óptima de replicación viral. Los frascos de cultivo se observaron diariamente en espera de aparición del efecto citopático esperado: lisis celular caracterizada por un redondeamiento celular inicial y posterior desprendimiento de la monocapa de células.

### **6.2.- Detección del gen de la proteína UL37 en CaHV-1 mediante PCR convencional.**

**6.2.1. Obtención del ADN viral.** El ADN viral se extrajo a partir de las células MDCK infectadas con el aislado RP5, una vez alcanzado un 80% de destrucción de la monocapa celular. Se realizaron 3 ciclos de congelamiento/descongelamiento del frasco inoculado, con el fin de lisar las células remanentes. Se sometieron a centrifugación de  $1.500\times\text{g}$  por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante para obtener las partículas virales. Se utilizó la solución de Chomczynski (Winkler, Ltda.) para obtener el ADN. Esta técnica consistió en mezclar 200  $\mu\text{l}$  de muestra con 1 ml del reactivo e invertir la muestra 3 veces. Se adicionaron 0,5 ml de etanol absoluto, para luego centrifugar a  $5.000\times\text{g}$  durante 5 minutos. El precipitado se lavó 2 veces con 1 ml de etanol 75%, invirtiendo el tubo 4 veces y se centrifugó a

1.000xg durante 2 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el ADN se solubilizó agregando 0.2 ml de agua libre de nucleasas (Chomczynski *et al.*, 1997)

**6.2.2 PCR convencional.** Para realizar esta técnica se utilizó un Termociclador Apollo (CLP, USA) de 96 pocillos de 0.2 ml.

**6.2.2.1 Partidores.** Para la detección de virus herpes canino (CaHV-1) se utilizaron partidores que fueron diseñados para amplificar un fragmento de 494 pares de bases (pb) de una región homóloga al gen de la proteína UL37 del virus *herpes simplex* humano (Erles *et al.*, 2004)(Anexo 1).

**6.2.2.2. Mezcla de reacción.** En un tubo Eppendorf de 0,2 ml, se mezclaron 5 ul de ADN viral, 15 ul de 2X PCR Master Mix (Taq ADN polimerasa recombinante, MgCl<sub>2</sub> y dNTPs) (Anexo 2) y 5 ul de cada partidor. Como control negativo se utilizó ADN bacteriano proveniente de *Salmonella* Enteritidis.

**6.2.2.3. Amplificación del ADN.** El protocolo del PCR incluye una desnaturación inicial a 95 °C durante 1 minuto, seguido de 35 ciclos de PCR (desnaturación 95°C, 1 minuto; alineamiento 49°C, 40 segundos; elongación a 72°C, 1 minuto). Finalmente una etapa de elongación final a 72°C durante 10 minutos. El tamaño esperado del producto de la amplificación por PCR es de 494 pb (Erles *et al.*; 2004)

**6.2.3. Detección viral mínima detectable por la prueba de PCR.** Para conocer la sensibilidad de esta técnica, se realizaron diluciones al décimo ( $10^{-1}$ - $10^{-8}$ ) del aislado viral RP5 (DICT<sub>50</sub> =  $1,58 \times 10^6$ /ml; es decir desde  $7,9 \times 10^3$  DICT<sub>50</sub> hasta  $7,9 \times 10^{-5}$  DICT<sub>50</sub>) para conocer la última dilución del aislado capaz de ser detectada molecularmente, en las mismas condiciones de amplificación.

### 6.3 Visualización del producto amplificado por PCR.

El ADN amplificado se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % (Winkler®) en buffer Tris acetato EDTA (TAE, Fermentas ®). El producto de PCR, se mezcló (5:1) con un tampón de carga (6X Mass Ruler Loading Dye Solution, Fermentas ®), que posee glicerol para dar densidad a la muestra y azul de bromofenol para verificar 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 90 volts por 90 minutos. Como marcador de tamaño molecular se utilizó un estándar que contiene fragmentos de ADN entre 100 y 1000 pb (Fermentas ®). Luego de la electroforesis, el gel se incubó en bromuro de etidio (0,5 µg/ml) (Fermelo ®) por 20 minutos y el ADN se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminator UVP ®).

#### **6.4 Medidas de Bioseguridad**

El trabajo de laboratorio se realizó acorde a los niveles de bioseguridad establecidos para los laboratorios de microbiología y virología animal: uso de material limpio, correcta eliminación de desechos y la utilización de delantal cerrado y guantes. 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 visualizar el gel se utilizaron una placa de acrílico y gafas con filtro UV. Posteriormente la eliminación del gel incubado en bromuro de etidio se eliminó de acuerdo al protocolo de manejos de residuos establecido en la Facultad, que contempló su incineración, pues el compuesto químico mencionado tiene -entre otras- propiedades mutagénicas

#### **6.5.- Identificación del ADN amplificado por PCR**

**6.5.1.- Purificación del amplificado.** Para realizar la secuenciación fue necesario realizar un proceso de purificación, en este caso, del producto del PCR directamente, utilizándose el kit comercial “*HiYield PCR ADN fragment extraction kit*” (Bioscience®). Brevemente, se transfirieron 100 µl de la mezcla de la reacción a un tubo de microcentrífuga, al cual se agregaron 5 volúmenes de Buffer DF al tubo y se mezcló en un vórtex. Se aplicó la mezcla a una columna DF ensamblada en un tubo de plástico de 2 ml. Se centrifugó a 10.000xg por 1 minuto a T° ambiente y se eliminó el líquido residual. Se agregaron 600 µl del tampón de lavado diluido en etanol absoluto y se centrifugó a 10.000xg por 1 minuto a T° ambiente. Se eliminó el líquido residual y se colocó nuevamente la columna en el tubo. Enseguida, se centrifugó la columna vacía por 2 minutos a T° ambiente. Se colocó en un tubo plástico de 1,5 ml y agregó 30 µl de agua libre de nucleasas, se incubó por 2 minutos a T° ambiente y se centrifugó por 2 minutos a 10.000xg para eluir el ADN. El eluido se guardó a -20°C.

Posteriormente el amplificado purificado se visualizó en un gel de agarosa al 2% y se determinó su concentración aproximada mediante un marcador de peso molecular, resultando en alrededor de 50 ng/ul.

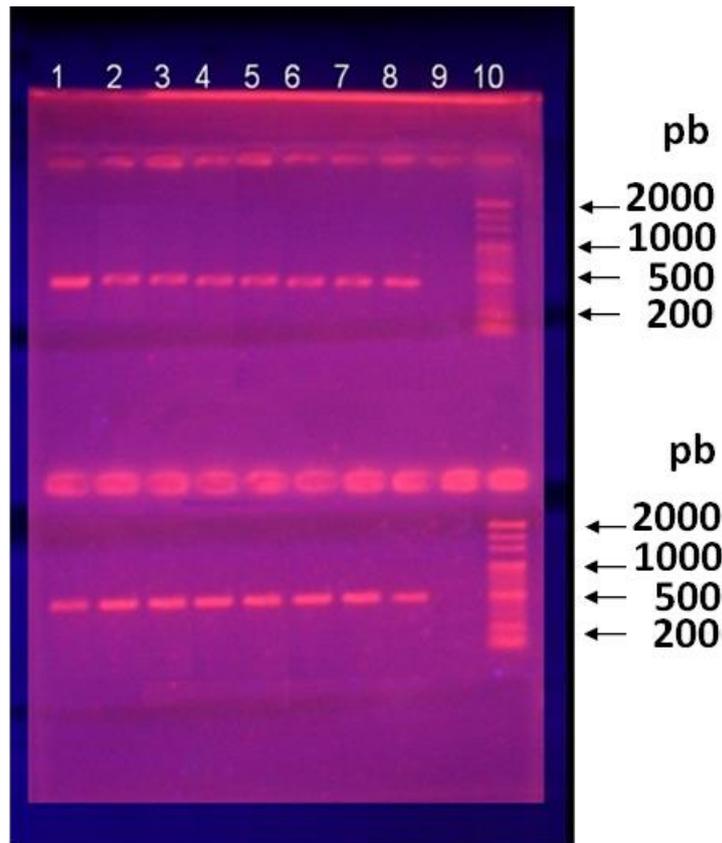
**6.5.2 Secuenciación.** Los fragmentos de ADN se enviaron en triplicado al Centro de Secuenciación de la empresa GENYTEC según sus requerimientos. Las secuencias fueron realizadas utilizando el Kit Big Dye Terminator, de Applied Biosystems, y para su lectura se ocupó el equipo ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (especificaciones GENYTEC)(Anexo 3).

**6.5.3 Análisis.** Usando el programa *on line* de libre acceso denominado Clustal W 2.2.012 las secuencias obtenidas se alinearon junto al fragmento del gen de la proteína UL37 homóloga del virus herpes canino (GenBank accession number AY582738) y se estableció el porcentaje de identidad nucleotídica (Thompson *et al.*, 1994).



## 7.2. Detección viral mínima detectable por la prueba de PCR.

Al considerar como muestras para el PCR las diluciones al décimo ( $10^{-1} - 10^{-8}$ ) a partir de un inóculo con  $DICT_{50} = 1.58 \times 10^6$  /ml, los resultados se observan en la figura 3, en la cual se registra la aparición de un fragmento de ADN de alrededor de 500 pb hasta la dilución  $10^{-7}$ .



<b>Carril 1</b>	: MT	<b>Carril 6</b>	: $7,9 \times 10^{-1}$ $DICT_{50}$
<b>Carril 2</b>	: $7,9 \times 10^3$ $DICT_{50}$	<b>Carril 7</b>	: $7,9 \times 10^{-2}$ $DICT_{50}$
<b>Carril 3</b>	: $7,9 \times 10^2$ $DICT_{50}$	<b>Carril 8</b>	: $7,9 \times 10^{-3}$ $DICT_{50}$
<b>Carril 4</b>	: $7,9 \times 10$ $DICT_{50}$	<b>Carril 9</b>	: $7,9 \times 10^{-4}$ $DICT_{50}$
<b>Carril 5</b>	: $7,9$ $DICT_{50}$	<b>Carril 10</b>	: $7,9 \times 10^{-5}$ $DICT_{50}$

**Figura 3.**  
**Detección viral mínima detectable por la prueba de PCR.**  
 (MT: Marcador de tamaño (100-2000 pb); Hyperladder, Fermentas®).

### 7.3. Secuenciación. Determinación de identidad nucleotídica.

Los amplificadores obtenidos fueron secuenciados con éxito (ver anexo 4). Se procedió a realizar un alineamiento múltiple para obtener la secuencia de consenso (AFA) y así compararla con el dato oficial del GenBank. (Anexo 5)

#### Secuencia de consenso (AFA)

TGGGAAACGATACAGTCCAGTACAACCCCATTTCAAGTTATAGATGCGT  
TAATTGGAGCTGGTTTTACACCTATTCATTGTGATATTTTAGAAAATGTT  
ATTGTAGATCAATATTCAAAAATTAATAATGGAAATCTATCTTTAGATG  
AAAAAATTCGCTAAACGATATTCACAAATTATAGGATGTATATCAAT  
TGTTGGTGGTTTGATATTTAAACTCTTACGAAAGTATGGTTATGGTTTA  
GAATATATAAAATTTTATACATCAACCCTTTCTGATTTAGAAGCTATATA  
TGGTGAATTATTAATTCAATTGGATTACCACATGGGGGTGTTGAGCAA  
ACAATTAGACATTGTATTGCTCCAATAGCCACTTCTTCCCGTTATAGAA  
TCAACTTATACATTGTTATTTCTTCCATGGTTTATT

Secuencia oficial: UL37 (GenBank accession number AY582738).

TGGGAAACGATACAGTCCGGTACAACCCCATTTCAAGTTATAGATGCGT  
TAATTGGAGCTGGTTTTACACCTATTCATTGTGATATTTTAGAAAATGTT  
ATTGTAGATCAATATTCAAAAATTAATAATGGAAATCTATCTTTAGATG  
AAAAAATTCGCTAAACGATATTCACAAATTATAGGATGTATATCAAT  
TGTTGGTGGTTCGATATTTAAACTCTTACGAAAGTATGGTTATGGTTTA  
GAATATATAAAATTTTATACATCAACCCTTTCTGATTTAGAAGCTATATA  
TGGTGAATTATTAATTCAATTGGATTACCACATGGGGGTGTTGAGCAA  
ACAATTAGACATTGTATTGCTCCAAAACCACGTTTAAAGTTTATAGAAT  
CAACTTATACAGCAATTATTGATGAATTAAATATT

Mediante el Programa Clustal W (2.0.12), se obtuvo un porcentaje de identidad nucleotídica (Score) de 94% entre la secuencia de consenso obtenida en esta memoria de título y la información disponible respecto del gen UL37 de virus Herpes canino (Cuadro 2) (Ver anexo 6).

**Cuadro 2**  
**Porcentaje de identidad nucleotídica entre la secuencia de consenso y la secuencia UL37 de GenBank.**

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
1	UL37	430	2	AFA	430	94

Adicionalmente, se compararon los porcentajes de identidad nucleotídica de la secuencia de consenso respecto de secuencias conocidas del gen UL37 de otras 6 especies de interés veterinario obtenidas del GenBank (Cuadro 3) (anexo 7).

**Cuadro 3**

**Comparación de porcentajes de identidad nucleotídica de secuencias del gen UL37 de otras 6 especies de interés veterinario respecto de la secuencia de consenso.**

<b>SeqA</b>	<b>Name</b>	<b>Len(nt)</b>	<b>SeqB</b>	<b>Name</b>	<b>Len(nt)</b>	<b>Score</b>
<b>1</b>	<b>AFA</b>	<b>430</b>	<b>2</b>	<b>CANINO</b>	<b>429</b>	<b>94</b>
1	AFA	430	2	FELINO	404	63
1	AFA	430	2	CERDO	432	40
1	AFA	430	2	POLLO	448	47
1	AFA	430	2	PATO	414	53
1	AFA	430	2	BOVINO	405	49
1	AFA	430	2	MANDRIL	439	46

## 8. DISCUSIÓN

El virus herpes canino tipo 1 (CaHV-1) es uno de los principales agentes infecciosos causante de desórdenes reproductivos en caninos y uno de los agentes etiológicos que ocasionalmente participa del síndrome respiratorio denominado traqueobronquitis infecciosa o “tos de las perreras”, aunque su rol en esta última patología por muchos años permaneció controvertido (Buonavoglia y Martella, 2007). Además, ha sido descrito como causante de una enfermedad neonatal que fue descrita por primera vez en Estados Unidos (Carmichael *et al.*, 1965) y actualmente numerosos informes le otorgan una distribución mundial. En Chile se ha aislado y caracterizado biológicamente una cepa nativa denominada RP5 (Navarro *et al.*, 2005).

Actualmente, en Chile no se disponen de métodos diagnósticos para la detección de CaHV-1 en casos clínicos sospechosos de estar infectados con este virus. Esta memoria es un primer paso en la implementación de una técnica precisa, sensible y efectiva para diagnóstico de cuadros sospechosos de virus herpes canino.

La técnica de la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR), es hoy en día una de las metodologías más rápidas para la detección de patógenos. Esta técnica posee una elevada sensibilidad y especificidad, presentando la posibilidad de analizar un gran número de muestras al mismo tiempo (Schrank *et al.*, 2001). Por ello, esta técnica es cada más utilizada como técnica diagnóstica en medicina humana, en patologías tan diversas como lo fue hace un año el brote de influenza H1N1, cuadros que fueron diagnosticados utilizando la técnica de PCR, como método diagnóstico para cuadros sospechosos. En medicina se utiliza la técnica del PCR por ser una técnica diagnóstica que detecta el gen blanco en distintos tipos de muestras: heces, cultivos y muestras biológicas.

El objetivo de esta memoria de título fue implementar el diagnóstico molecular del virus herpes canino, por medio de la técnica de PCR, para complementar la caracterización biológica del aislado RP5 del virus herpes canino (Navarro *et al.*, 2005). Este aislado viral se obtuvo a partir de riñón fetal canino de un cachorro sospechoso de contagio y generó inicialmente efecto citopático en cultivos primarios de riñón y pulmón canino, y posteriormente en la línea celular continua MDCK. Posteriormente, para confirmar el

aislado como CaHV-1, se detectó la presencia de antígenos virales empleando un conjugado fluorescente constituido por un anticuerpo policlonal dirigido contra glicoproteínas de envoltura del CaHV-1 (Navarro *et al.*, 2003). En relación al trabajo propuesto y desarrollado en esta Memoria de Título sería interesante hacer notar algunas consideraciones:

En primer lugar, el trabajo de laboratorio fue llevado a cabo sin mayores inconvenientes y con la experiencia obtenida se corroboró que el momento más crítico de la prueba del PCR, es la mezcla de la reacción del PCR. No solo por los volúmenes de reactivos utilizados en la mezcla de reacción, sino por que cualquier contaminación en esta etapa producirá errores en la amplificación, lo cual se traduce en resultados erróneos, o al menos, confusos. Para enfrentar estos inconvenientes, se recomienda seguir de manera rigurosa las prácticas de laboratorio, como utilizar pipetas calibradas, instrumentos de trabajo en buen estado, evitar la presencia de polvo o cualquier contaminación y utilizar reactivos de calidad certificada y garantizada por el proveedor (Wolcott, 1992). Por lo tanto, al realizar las pruebas de PCR en el laboratorio, se tomaron medidas precautorias tendientes a evitar errores en la amplificación, utilizando un sector cerrado y exclusivo para realizar la mezcla de los reactivos del PCR, sector que fue sometido a luz ultravioleta la noche anterior a su utilización, para así evitar que las muestras pudiesen contaminarse con ADN extraño o aerosoles presentes en el laboratorio.

En segundo lugar, la realización de un PCR convencional utilizando los partidores que amplifican un fragmento de 494 pares de bases de una región homóloga al gen de la proteína UL37 del virus *Herpes Simplex* humano (Erles *et al.*, 2004) permitió obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 500 pb, nítido, único y que presumiblemente correspondería a la secuencia blanco buscada del gen de la proteína UL37 del virus herpes. Lo anterior en conjunto con que el gen UL37 codifica un polipéptido de 120-kDa fosforilado, que se expresa tarde en el ciclo de replicación del virus y que corresponde a una proteína altamente conservada entre los integrantes de la familia *Herpesviridae* (Schmitz *et al.*, 1995; Loret *et al.*, 2008), permitiría sostener que la elección del gen UL37 como blanco a detectar mediante PCR, representó una alternativa válida y valiosa para iniciar la caracterización molecular del aislado RP5 nativo.

En tercer lugar, si la especificidad de una reacción de PCR está dada por los partidores utilizados, la técnica implementada cumple con esta característica, pues al utilizar muestras de ADN de cepas de *Salmonella* Enteritidis (control negativo) no hubo amplificación, corroborado por la inexistencia de fragmentos o bandas fluorescentes en la visualización del gel de agarosa. Por lo tanto, los partidores utilizados son específicos para virus Herpes. Por otra parte, al establecer que la dilución viral mínima detectable era de 0,00079 DICT<sub>50</sub> y en relación a sensibilidad de la técnica implementada, se puede afirmar que este PCR es capaz de realizar una detección molecular de ADN viral a concentraciones cientoventiseis mil veces menor a la necesaria para provocar efecto citopático de lisis celular en cultivos experimentales.

En cuarto lugar, esta técnica de PCR demuestra ser una técnica efectiva para el diagnóstico de virus herpes canino, por sobre otras pruebas diagnósticas como el aislamiento viral o la serología, teniendo como ventaja la elevada sensibilidad de la técnica, además de la ventaja en los tiempos de entrega de resultados (5 horas aproximadamente). Lo anterior, es de alta importancia desde el punto de vista económico debido a que esta enfermedad provoca problemas reproductivos, con lo cual se hace necesaria la detección temprana del CaHV1 para así descartar posibles candidatos en la elección de reproductores. En relación a los resultados obtenidos, esta técnica de detección entrega resultados que dan pie a continuar con el siguiente paso de esta investigación: montar la técnica para ser probada en muestras provenientes de animales sospechosos de estar infectados por virus Herpes canino.

En quinto lugar, el análisis de las secuencias obtenidas permite afirmar que el aislado viral RP5, representa una alternativa válida para ser utilizado como control positivo, pues la comparación del porcentaje de identidad nucleotídica (PIN) entre el amplificado obtenido (AFA) y las secuencias del gen UL37 presentes en virus herpes de otras 7 especies animales de interés veterinario disponibles en el GenBank, permite determinar que la más alta similitud entre la secuencia obtenida (AFA) se establece con el virus herpes canino (PIN=94%) y en segundo la secuencia UL37 del virus herpes felino (PIN=63%). En otras palabras, estos resultados permiten asentar que la técnica de PCR descrita permite detectar un gen presente en el aislado RP5 y que la secuencia de este

gen tiene una identidad nucleotídica de 94% con la secuencia descrita para el gen de la glicoproteína UL37 del CaHV1, según la información oficial existente en el GenBank.

En sexto lugar, el éxito alcanzado en esta memoria de título en relación al uso de los partidores descritos, permitiría en un futuro próximo implementar esta técnica para detectar el gen UL37 felino, bovino, porcino o presente en otra especie de interés veterinario.

Así, después de revisar los procedimientos prácticos de laboratorio y de analizar los resultados de la secuenciación del amplificado nacional alineado frente al dato oficial registrado en GenBank (accession number AY582738) *-que han permitido obtener un alto porcentaje de identidad nucleotídica, confirmando que el aislado RP5 corresponde al CaHV1-* con esta memoria de título se inició su caracterización molecular, la que complementada con otras memorias desarrolladas en forma paralela y que investigan otros genes blanco como el gen de la glicoproteína B y el de la Timidin Kinasa, permitirán elegir la mejor técnica diagnóstica molecular para la detección del virus Herpes canino. No obstante lo anterior, un desafío inmediato que deja esta investigación es la de establecer partidores para un PCR a partir de la cepa nacional RP5 ya caracterizada molecularmente como CaHV1, para así desarrollar una técnica molecular diagnóstica, en contrapartida al uso de la técnica comercial K039 que utiliza una cepa de origen europeo.

Lo anterior, sin duda, conectará la actividad del laboratorio con un problema existente en los plantales reproductores caninos, al tener la posibilidad de ofrecer la detección del CaHV1 mediante una herramienta molecular que permita cumplir con las características del diagnóstico actual: rápido, sensible, específico y de bajo costo en un área de sostenido crecimiento: el de los pequeños animales como mascotas de compañía.

Por último, la detección del CaHV-1 en muestras de animales sospechosos es el real desafío para el futuro y el propósito final de la investigación, ya que en Chile no se cuenta con técnica diagnóstica alguna de este virus, aún.

## **9. CONCLUSIONES**

- 1.-** En esta memoria de título se describe por primera vez en Chile el diagnóstico molecular del virus herpes canino por la detección del gen UL37 mediante la técnica de PCR.
  
- 2.-** El porcentaje de identidad nucleotídica de 94% permite afirmar que el aislado nacional RP5 corresponde al virus herpes canino. Por lo tanto, esta caracterización molecular complementa la caracterización biológica previa.
  
- 3.-** Se determinó que la concentración viral mínima detectable por la prueba de PCR fue de 0,00079 DICT<sub>50</sub>, lo cual representaría alta sensibilidad de la técnica.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

**APPEL, M.; BEMIS, D.** 1978. The canine contagious respiratory disease complex (kennel cough). *Cornell Vet.* 68: 70-75.

**BATTERSON, W & ROTZMAN B.** 1983. Characterization of the herpes simplex virus associated factor responsible for the induction of alpha genes. *J Virol* 46: 371-377.

**BEMIS, DA.; CARMICHAEL, LE.; APPEL MJ.** 1977. Naturally occurring respiratory disease in a kennel caused by *Bordetella bronchiseptica*. *Cornell Vet.* 67: 282-293.

**BOEHMER, P.; LEHMAN, I.** 1997. Herpes simplex virus DNA replication. *Ann Rev Biochem* 66: 347-384.

**BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V.** 2007. Canine respiratory viruses. *Vet. Res.* 38: 355-373.

**BURR, P. D.; CAMPBELL, M. E. M.; NICOLSON, L.; ONIONS, D. E.** 1996. Detection of canine herpesvirus 1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 53: 227-237.

**CARMICHAEL, LE.** Herpesvirus canis. 1970: aspects of pathogenesis and immune response. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 156: 1714-1725.

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

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

**CELEDON, M.; PIZARRO, J.; NAVARRO, C.** 2000. Apunte docente "Virología Avanzada". Curso de Postgrado. Programa de Magister en Ciencias Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. 31 páginas.

**CHABCHOUB, A.; KALLEL F.; HADDAD, S.; LANDOLSI, F., VAN GOOL, D.** 2006. Evaluation de l'efficacité de la vaccination antiherpes (vaccin inactivé) chez la chienne reproductrice selon deux protocoles différents : essai de terrain. *Revue Méd. Vét.*, 157, 12, 573-578.

**CHOMCZYNSKI, P.; MACKEY, K.; DREWS, R, WILFRENFER, W.** 1997. DNazol: A reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Biotechniques*. 22: 550-553.

**CURTIS, W.; DEWEY.** 2003 , Blackwell publishing. second edition. Cap 9 cerebellar disease and tremor syndromes practical guide to canine and feline neurology. pag 306 Canine herpes.

**DANCHIN, A.; YUEK, K.Y.** 2002. Bacterial genomics in the study of Virulence. In SUSSMAN Molecular medical microbiology. Barcelona. España . Academic press. Pp;341-353.

**DESAI P.J** 2000. A null mutation in the UL36 gene of herpes simplex virus type 1 results in accumulation of unenveloped ADN filled capsids in the cytoplasm of infected cells. *J Virol* 74: 11608-11618.

**ERLES K, BROWNLIE J.** 2005. Investigation into the causes of canine infectious respiratory disease: antibody responses to canine respiratory coronavirus and canine herpesvirus in two kennel populations. *Arch. Virol.* 150: 1493-1504.

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

**GALLOSI, CM.** 2007. Herpesvirus 1: Agente etiológico y enfermedad. *Analecta veterinaria* 27: 5-12.

**GENEKAM BIOTECHNOLOGY.** Catalogo en línea. Manual k093 <http://www.genekam.de> (consulta 08/09/2010).

**GENYTEC. LABORATORIO DE GENÉTICA Y TECNOLOGÍA.** En Línea. <http://www.genytec.cl/secuenciacion.html>. (consulta 19/08/10)

**HASHIMOTO, A.; HIRAI K.** 1986. Canine herpesvirus infection. En: Morrow DA, editor. Current therapy in theriogenology Vol 2, Diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals., WB Saunders Philadelphia, USA; p. 516- 20.

**HASHIMOTO, A.; HIRAI, K.; YAMAGUCHI, T.; FUJIMOTO, Y.** 1982. Experimental transplacental infection of pregnant dogs with canine herpesvirus. *Am J Vet Res* 44: 610-614.

**HILL, H.; MARE, C.** 1974. Genital disease in dogs caused by canine herpesvirus. *Am J Vet Res* 35: 669-672.

**HIRAI, K.; MIYOSHI, A.; YAGAMI, K.; KATO, N.; KUNIHIRO, K.; FUJIURA, A.** 1978. Isolation of herpesvirus from naturally occurring case with hemorrhagic and necrotizing lesion of puppies. *Res. Bull. Gifu. Univ.*; 41: 139-153.

**HUXSOLL D.L., HEMELT I.E.** 1970. Clinical observations of canine herpesvirus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 156, 1706-1713.

- KLUPP B., FUCHA W., GRAZOW H., NIXDORFT T & METTENLEITER T.** 2002. Pseudorabies virus UL36 tegument protein physically interacts with the UL37 protein. *J Virol* 76:3065-3071.
- KRAFT S, EVERMANN JF, MC KEIRNAN AJ, RIGGS M.**1986 The role of neonatal canine herpesvirus infection in mixed infections in older dogs. *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet* 8: 688-694.
- KIM, O.; YI, SJ.; MIYOSHI, M.; ISHII Y.** 2005. The replication of canine herpesvirus (CHV) induces apoptosis in canine kidney cell line. *Acta Vet. Hung* 53: 147-151
- KELLY, B.; FRAEFEL, C.; CUNNINGHAM, A.; DIEFENBACH, R.** 2009. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Res* 145: 173–186.
- LACHERETZ, A.** 1987. Vaccines and vaccination of pet-dogs. *Journées de Pédiatrie canine, Toulouse* (France), 13-14. v. 140(2) p. 95-105.
- LACHERETZ, A.; COGNARD, S.** 1998. Epidemiologie et diagnostic serologique de l'herpesvirose canine. *Rev Med Vet.* 149:853 – 856.
- LARENAS J.; SANTIBÁÑEZ M.C.; BERRÍOS P.** 1992. Primeros antecedentes en Chile de infección por herpes canino con mortalidad neonatal. *Mevepa* 1: 13-16.
- LORET, S.; GUAY, G.; LIPPE, R.** 2008. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J. Virol.* 82: 861–865.
- LOVE, D., HUXTABLE,R.** 1976. Naturally-occurring neonatal canine herpesvirus infection. *Vet. Rec.* 99: 501-503
- McCANDLISH, IA.; THOMPSON, H.; CORNWELL, HJ.; WRIGHT, NG.**1978. A study of dogs with kennel cough. *Vet. Rec.*102: 293-301.
- METTENLEITER, T.C.** 2003. Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. *Virus Res* 92:197-206.
- MORRESEY, P.** .2004. Reproductive Effects of Canine Herpesvirus. *Compendium CE.* Article. 4 october;804-811.
- MULLIS, K.** .1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262 (4): 56-61, 64-5. *Compendium University of Pennsylvania.* Article 4, 804-810.
- MURPHY, F.; GIBBS, E.; HORZINEK, M.; STUDDERT.M.**2003. *Veterinary Virology.* Third Edition. Chapter 18. Herpesviridae pag 302.
- NAVARRO, C.; CELEDON, M.; PIZARRO, J.** 2003. Detección de virus herpes canino tipo 1 en Chile. *Arch. Med. Vet.*35:243-248.

**NAVARRO, C.; CELEDON, M.; PIZARRO, J.; GAGGERO, A.** 2005. Virus herpes canino tipo 1 en Chile. I. Propiedades biológicas. *Arch Med Vet* 37: 133-137.

**NCBI; THE NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.** En línea. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (consulta 19/08/10)

**PELLETT, P.E.; ROIZMAN, B.** 2007. The family Herpesviridae : a brief introduction. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 2479.

**PENNINGTON, T.** 2002. Electrophoretic typing. In SUSSMAN *Molecular medical microbio microbiology*. Barcelona. España . Academic press. Pag; 535-547

**PLUMMER, G.; GOODHEART, C.; HENSON, D.; BOWLING** 1996  
C. A comparative study of the ADN density and behavior in tissue cultures of fourteen different herpesviruses. *Virology* 39, 134-137.

**POSTE G., KING N.** 1971. Isolation of a herpesvirus from the canine genital tract: association with infertility, abortion and stillbirths. *Vet. Rec* **88**, 229-233.

**POULET, H.; DUBOURGET, P.** 1993. L'herpès virose canine. *Point Vét.* **25**, 69-75.

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

**REED LJ., MUENCH, H.** 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J Hyg.* 27: 493-497.

**REMOND M., SHELDRIK P., LEBRETON F., NARDEUX P., FOULON T.** 1996. Gene organization in the UL region and inverted repeats of the canine herpesvirus genome. *J. Gen. Virol.* **77**, 37-48.

**ROBINSON, AJ.; CRERAR, SK.; WAIGHT SHARMAN, N.; MULLER WJ.; BRADLEY, MP.** 2005. Prevalence of serum antibodies to canine adenovirus and canine herpesvirus in the european red fox (*Vulpes vulpes*) in Australia. *Aust. Vet. J.* 83: 356:361

**RONSE, V.; H. POULET; J. VERSTEGEN ; E, THIRTY.** 2003. L` herpes virose canine. *Ann. Med. Vet.* 2003. 147:65-76.

**SALMON B., CUNNINGHAM C., DAVISON A., HARRIS W., & BALNES.** 1998. The herpes simplex virus tipe 1 UL17 gene encodes virion tegument proteins that are required of cleavage and packaging of viral ADN. *J Virol* 72: 3779-3788.

**SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. edición, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. [ISBN 0-87969-576-5](https://doi.org/10.1002/9781118174643).

**SCHRANK, I.S., MORES, M.A.A., COSTA, J.L.A., FRAZZON, A.P.G., SONCINI, R., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H., SILVA, S.C** 2001. Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect Salmonella in poultry industry products and clinical samples. *Vet Microb.* 82:45-53.

**SCHMITZ, J. B.; ALBRIGHT, P.R.; KINCHINGTON, P AND F.J, JENKINS.** 1995. The UL37 protein of herpes simplex virus type 1 is associated with the tegument of purified virions. *Virology* 206:1055–1065.

**SCHULZE, C.; BAUMGARTNER.**1998. Nested Polymerase Chain Reaction and in situ Hybridization for diagnosis for canine Herpesvirus infection in puppies. *Vet pathol.* 35:209-217.

**SODEIK, B.; EBERSOLD, M & HELENLUS.** 1997. Microtubule mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol.* 136; 1007-1021.

**THÉBAULT A.** 2004: Prophylaxie de l'herpesvirose en élevage canin. *Point Vet.*, 2004, 245, 18-23.

**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. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680

**UELAND, K.** 2003. Serological, bacteriological and clinical observations on an outbreak of canine infectious tracheobronchitis in Norway. *Vet. Rec.*126: 481-483.

**WANG, Z.; GERSHON, M.; LUNGU, O.; MALLORY, S.; ARVIN A & GERSHON A.** 2001. Essential role played by C-terminal domain of glycoprotein in envelop of varicela-zoster virus in the trans golgi network interactions of glycoproteins with tegument. *J Virol* 75; 323-340.

**WILSON, I. G.** 1997. Minireview: Inhibition and facilitation of Nucleic acid amplification. *Ap and Env Microb.* 63(10):3741-3751.

**WOLCOTT , M. J.** 1992. Advances in Nucleic Acid-Based Detection Methods. *Clin Microb Rev.* 5 (4):370-386.

## ANEXO 1

<b>Partidores Utilizados</b>
Gen UL37 (Erles <i>et al.</i> , 2004)

- CHV1: 5'-AAGAGCTCGTGTTAGTGAAAAT-3'
- CHV2: 5'-TAAACCCGCTGGATGATAC-3'

Protocolo del PCR (Erles *et al.*, 2004)

**Desnaturación inicial a 95°C durante 1 minuto**

<b>Desnaturación 95°C , 1 minuto</b>	<b>40 ciclos</b>
<b>Alineamiento 49°C , 40 segundos</b>	
<b>Elongacion 72°C , 1 minuto</b>	

**Elongación final a 72°C durante 10 minutos**

**Amplificación de fragmentos de 494 pares de bases**

## ANEXO 2.

### COMPOSICION DEL 2X PCR MASTER MIX (FERMENTAS®):

- Taq ADN polimerasa recombinante: 0.05 unidades/uL,
- Buffer de reacción.
- MgCL <sub>2</sub> 4mM
- dNTPs ( dexosinucleotidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 0,4 mM

Se utilizaron 15 uL de esta mezcla por reacción.

## ANEXO 3

### Protocolo.

#### Envío de amplicones para secuenciación (Laboratorio GENYTEC)

Los protocolos del laboratorio son los siguientes:

**Cantidad de ADN a enviar:** 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 sería 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).

<b>Características de la Muestra Enviada a Secuenciar</b> (Protocolo Laboratorio GenYtec)				
<b>Código</b>	<b>Tamaño (pb)</b>	<b>Concentración (ng/ul)</b>	<b>Volumen (ul)</b>	<b>Partidor</b>
U1	494	50	4	CHV1- CHV2
U2	494	50	4	CHV1- CHV2
U3	494	50	4	CHV1- CHV2

Se envió a secuenciar el fragmento de ADN amplificado (AFA) en triplicado a la empresa GENYTEC, en conjunto con los partidores de la reacción de PCR, recibándose las siguientes secuencias (1.A; 2.B; 3.C; 4.D; 5.E)

**>1.A**

```
CAGGGAAAACGAGAGGGGGGAAAAAATAACCCCATTTAAGAACCGAGGGGA
GAACTGAAGTTGGGTTTACACCTATTCTGTGATATATTAAGGTTATT
GTTGATCAAATTCAAAAAAAAAAAAAGGAAACCTATCTTTAAATGAAAAAA
TTCGCTAAACCATATTTCAACAAATTATAGGGATGTATATCAATTGGGTGGG
TGGGTTGATATTTAAACCCCTACCAAAGTTTTGGTTATGGGTTTAAAAAA
ATATAAAATTTTATACCCCTACCCCTTTCTGTATTTATAAACCTATTTT
GGGGGGGAAATATTAATTCATTGGGATTACCCCTGGGGGGGTGGTG
TGAGCAAACAAAATATGACCTTGGATTTGCCCAAACCCCGTAAAAG
GAAAAGGAATCCACCTTATACCAGCCATTTATTGGATGAAAATTAATA
TTTGGTTGGAAAACCGTGTATCATCCAGCCGGGTTTTAAAA
```

**>2.B**

```
CAGAGACCCGAGGGGGGAAAAAATCCCCCTTTTATTACGAAGCGGGAAAC
GAAGGTGGTTTTACACCTATTCTTGTGAATTTTAAAAAATGTTATTGTTTTAA
CATTCAAAAATTAAGGCCATCTATCTTTATATGAAAAAATTCGCTA
AACGATATTCAACAAATTATAGGATGTATATCAATTGTTGGTGGTTTGATAT
TTAAACCCTTACCAAAGTATGGGTATGGTTTAAAAAATATAAAATTTTATAC
CTCCACCCTTTTCTGAATTAAGCTATTTATGGTGAATTATTAATTCATT
TGGATTACCACATGGGGGTGTTGAACACAACCATTAAACATTGGATTGCTCC
CCAATCATCTTTTATATTTATAGAATCAACTTATCAGCATTTTTGATGAATTA
AATATTGTTGAAAACGTGTATCATCCCCGGTTTAA
```

**>3.C**

```
TTAAGAGCCTCGTGTTAGTGAAAATGCAACAGGTACGTGGGAAACGATACA
GTCCAGTACAACCCCATTTCAAGTTATAGATGCGTTAATTGGAGCTGGTTTT
ACACCTATTCATTGTGATATTTTAGAAAATGTTATTGTAGATCAATATTCAA
AAATTAAGGAAATCTATCTTTAGATGAAAAAATTCGCTAAACGATA
TTCAACAAATTATAGGATGTATATCAATTGTTGGTGGTTTGATATTTAACT
CTTACGAAAGTATGGTTATGGTTTAGAATATATAAAATTTTATACATCAACC
CTTTCTGATTTAGAAGCTATATATGGTGAATTATTAATTCATTGGATTAC
CACATGGGGGTGTTGAGCAAACAATTAGACATTGTATTGCTCCAATAGCAC
TTTCCCGTTTTGAATCAGCTTATGCATTTATTTTTCCCGTTTTTTTTTTT
```

**>4.D**

AAGAGGCTTCGTGTTAGTGAAAATGCAACAGGTACGTGGGAAACGATACAG  
TCCCAGTACAACCCCATTTCAAGTTATAGATGCGTTAATGGGAGCTGGTTTT  
TACACCTATTCATTGTGATATTTTAGAAAATGTTATTGTAGATCAATATTCA  
AAAATTA AAAATGGAAATCTATCTTTAGATGAAAAAAATTCGCTAAACGAT  
ATTCAACAAATTATAGGATGTATATCAATTGTTGGTGGTTTGATATTTAAAC  
TCTTACGAAAGTATGGTTATGGTTTAGAATATATAAAAATTTTATACATCAAC  
CCTTTCTGATTTAGAAGCGGATATATGGTGAATTATTA AATTCGTTGGATTA  
CCACATGGGGGTGTTGAGCAAACAATTAGACATTGTATTGCTCCATTTCCCTT  
TCCTTCCCGTTTTAGAATCAGCTTAGAATTTTTTTTTCTTCCCGGGTTTATTT  
TG

**>5.E**

TTTAAGAGCTCGTGTTAGTGAAAATGCAACAGGTACGGTGGGAAACGATAC  
AGTCCCAGTACAACCCCATTTCAAGTTATAGATGCGTTAATTGGAGCTGGT  
TTTACACCTATTCATTGTGATATTTTAGAAAATGTTATTGTAGATCAATATT  
CAAAAATTA AAAATGGAAATCTATCTTTAGATGAAAAAAATTCGCTAAAC  
GATATTCAACAAATTATAGGATGTATATCAATTGTTGGTGGTTTGATATTTA  
AACTCTTACGAAAGTATGGTTATGGTTTAGAATATATAAAAATTTTATACATC  
AACCTTTCTGATTTAGAAGCTATATATGGTGAATTATTA AATTCAATTGGA  
TTACCACATGGGGGTGTTGAGCAAACAATTAGACATTGTATTGCTCCAATTT  
CCACTTTTTCCGTTTTAGAATCAACTTATACATTCTTACCTCTTCCTTGGTTA  
ATT

Las secuencias fueron obtenidas utilizando el Kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems ®), y para su lectura se ocupó el equipo ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.  
(Fuente: Laboratorio Genética y Tecnología Ltda.)

## ANEXO 5 Resultados Alineamiento múltiple

```

3.C      -TTAAGAGCCTCGTGTTAGTGAAAAATGCAACAGGTACG-TGGGAAACGATACAGTCC-AG  57
5.E      TTTAAGAGC-TCGTGTTAGTGAAAAATGCAACAGGTACGGTGGGAAACGATACAGTCCCAG  59
4.D      --AAGAGGCTTCGTGTTAGTGAAAAATGCAACAGGTACG-TGGGAAACGATACAGTCCCAG  57
1.A      -----CAGGGAAAACGAGAGGGGGGAAAA  23
2.B      -----CAGAGACCCGAGGGGGGAAAA  20
                * * * * *

```

```

3.C      TACAACCCC-ATTTCAAGTTATAGATGCGTTAATTGGAGCTGGTTTTT-ACACCTATTCAT  115
5.E      TACAACCCCCATTTCAAGTTATAGATGCGTTAATTGGAGCTGGTTTTT-ACACCTATTCAT  118
4.D      TACAACCCC-ATTTCAAGTTATAGATGCGTTAATTGGGAGCTGGTTTTTACACCTATTCAT  116
1.A      AATAACCCC-ATTTAAGA--ACCGAGGGGAGAAGTGAAGTTGGGTTT-ACACCTATTC-C  78
2.B      AATCCCCC-CTTTTATT--AC-GAAGCGGGAACGAAGGTGGTTTTT-ACACCTATTC-T  74
                * * * * *

```

```

3.C      TGTGATATTTT-AGAAAATGTTATTGTAGATCAATATTCAAAAATTA AAAATGGAAATCT  174
5.E      TGTGATATTTTGTAGAAAATGTTATTGTAGATCAATATTCAAAAATTA AAAATGGAAATCT  178
4.D      TGTGATATTTT-AGAAAATGTTATTGTAGATCAATATTCAAAAATTA AAAATGGAAATCT  175
1.A      TGTGATATATT-AAAAAAGTTATTGTGTGATCAA-ATTCAAAAAA-AAAAAAGGAAACCT  135
2.B      TGTGA-ATTTT-AAAAAATGTTATTGTTT-TAAC-ATTCAAAAATTA AAAAAGGCCATCT  130
                * * * * *

```

```

3.C      ATCTTTAGATGAAAAAAA-TTCGCTAAACGATATT-CAACAAATTATAGG-ATGTATATC  231
5.E      ATCTTTAGATGAAAAAAAATTCGCTAAACGATATT-CAACAAATTATAGG-ATGTATATC  236
4.D      ATCTTTAGATGAAAAAAA-TTCGCTAAACGATATT-CAACAAATTATAGG-ATGTATATC  232
1.A      ATCTTTAAATGAAAAAAA-TTCGCTAAACCATATTTCAACAAATTATAGGGATGTATATC  194
2.B      ATCTTTATATGAAAAAAA-TTCGCTAAACGATATT-CAACAAATTATAGG-ATGTATATC  187
                * * * * *

```

```

3.C      AATT--GTTGGTGGTTTGATATTTAAACTCT-TACGAAAG--TATGGTTATGGTTT--AG  284
5.E      AATT--GTTGGTGGTTTGATATTTAAACTCT-TACGAAAG--TATGGTTATGGTTT--AG  289
4.D      AATT--GTTGGTGGTTTGATATTTAAACTCT-TACGAAAG--TATGGTTATGGTTT--AG  285
1.A      AATTGGGTGGGTGGGTTGATATTTAAACCCCTACCAAAAGTTTGGTTATGGGTTTAAA  254
2.B      AATT--GTTGGTGGTTTGATATTTAAACCCCT-TACCAAG--TATGGTTATGGTTT--AA  240
                * * * * *

```

```

3.C      AATATATAAAATTTTATACATCAAC----CCTTTCTG-ATTTAGAAGCT-ATATATGG--  336
5.E      AATATATAAAATTTTATACATCAAC----CCTTTCTG-ATTTAGAAGCT-ATATATGG--  341
4.D      AATATATAAAATTTTATACATCAAC----CCTTTCTG-ATTTAGAAGCGGATATATGG--  338
1.A      AAAATATAAAATTTTATACCCCCACCCCTTTCTGTATTTATAAACCTATTTTGGGG  314
2.B      AAAATATAAAATTTTATACCTCCAC---CCTTTCTGAATTAA--AAGCTATTTATGG--  293
                * * * * *

3.C      -TGAATTATTTAAA-TTCAATT-GGATTACCAC---ATGGGGGTGTTG--AGCAAACA--A  386
5.E      -TGAATTATTTAAA-TTCAATT-GGATTACCAC---ATGGGGGTGTTG--AGCAAACA--A  391
4.D      -TGAATTATTTAAA-TTCG-TT-GGATTACCAC---ATGGGGGTGTTG--AGCAAACA--A  387
1.A      GGGAAATATTTAAAATTCAATTGGGATTACCCCCCTGGGGGGTGGTGTGAGCAAACAAA  374
2.B      -TGAATTATTTAAA-TTCCATTTGGATTACCAC---ATGGGGGTGTTGAACACAACCATTA  348
                * * * * *

```

```

3.C      TTAGACATTGTATT-GCTCCAATAGC-ACTT-TTCCCGTT--TT-GAATCAGCTTATGCA 440
5.E      TTAGACATTGTATT-GCTCCAATTTCCACTT-TTTCCGTT--TTAGAATCAACTTATACA 447
4.D      TTAGACATTGTATT-GCTCCATTTCCCTTTTCCCTTCCCGTT--TTAGAATCAGCTTAGA-A 443
1.A      TATGACCTTGGATTTGCCCCCAAACCCCGTAAAAGGGAAAAGGAATCCACCTTATAC 434
2.B      ---AACATTGGATT-GCTCCCAATCATCTTTTATATTT---ATAGAATCAACTT---AT 398
          ** *** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

3.C      T--TTATTTTTTCCCCCGTTTTTTTTTTT----- 467
5.E      TTCTTACCTCTTCCCTGGTTAATT----- 471
4.D      TTTTTTTTCTTCCCGGTTTATTTTG----- 470
1.A      CAGCCATTTATTGGATGAAAATTAATAATTTGGTTGGAAAAACCGTGTATCATCCAGCC 494
2.B      CAGC-ATTTTT--GATGAA--TAAATATT--GTTGAAAA---CGTGTATCATCC--CC 445
          * * * * *

```

SeqA	Name	Len (nt)	SeqB	Name	Len (nt)	Score
1	1.A	505	2	2.B	453	82
1	1.A	505	3	3.C	467	61
1	1.A	505	4	4.D	470	62
1	1.A	505	5	5.E	471	63
2	2.B	453	3	3.C	467	73
2	2.B	453	4	4.D	470	72
2	2.B	453	5	5.E	471	71
<b>3</b>	3.C	467	<b>4</b>	4.D	470	<b>95</b>
<b>3</b>	3.C	467	<b>5</b>	5.E	471	<b>95</b>
<b>4</b>	4.D	470	<b>5</b>	5.E	471	<b>93</b>



## ANEXO 7

### Porcentaje de identidad nucleotídica UL37.

Se comparó el porcentaje de identidad de identidad nucleotídica entre el amplificado obtenido (AFA) y 7 tipos de secuencias de UL37 de distintas especies animales de interés veterinario, obteniéndose resultados de baja identidad nucleotídica con respecto al aislado nacional, lo que nos lleva a determinar que, la técnica detección de UL37 de virus herpes canino presentada en esta memoria de título una alta especificidad.

#### 1). Amplificado AFA

```
TGGGAAACGATACAGTCCAGTACAACCCCATTTCAAGTTATAGATGCGTTA
ATTGGAGCTGGTTTTACACCTATTCATTGTGATATTTTAGAAAATGTTATTGT
AGATCAATATTCAAAAATTA AAAATGGAAATCTATCTTTAGATGAAAAAAA
TTCGCTAAACGATATTCAACAAATTATAGGATGTATATCAATTGTTGGTGGT
TTGATATTTAAACTCTTACGAAAGTATGGTTATGGTTTAGAATATATAAAAT
TTTATACATCAACCCTTTCTGATTTAGAAGCTATATATGGTGAATTATTA
TTCAATTGGATTACCACATGGGGGTGTTGAGCAAACAATTAGACATTGTATT
GCTCCAATAGCCACTTCTCCCGTTATAGAATCAACTTATACATTGTTATTC
TTCCATGGTTTTATT
```

#### 2). UL37 Herpes canino. GenBank: AY582738

```
TGGGAAACGATACAGTCCGGTACAACCCCATTTCAAGTTATAGATGCGTTA
ATTGGAGCTGGTTTTACACCTATTCATTGTGATATTTTAGAAAATGTTATTGT
AGACAATATTCAAAAATTA AAAATGGAAATCTATCTTTAGATGAAAAAAAT
TCGCTAAACGATATTCAACAAATTATAGGATGTATATCAATTGTTGGTGGTT
CGATATTTAAACTCTTACGAAAGTATGGTTATGGTTTAGAATATATAAAATT
TTATACATCAACCCTTTCTGATTTAGAAGCTATATATGGTGAATTATTA
TCAATTGGATTACCACATGGGGGTGTTGAGCAAACAATTAGACATTGTATTG
CTCCAAAACCACGTTTAAAGTTTATAGAATCAACTTATACAGCAATTATTGA
TGAATTAATATT
```

#### 3). Felid herpesvirus 1 strain C-27. GenBank: FJ478159.2

```
TGGGAGGTTATCCAGGCGAGCACGAATCCACATCAAGCCATAGAGGCGCTT
ATTCAAGCAGGATTTACATCATTTTCATTGTAGTATGTTAGAACGTGCCATCT
CCGATAAATTTTCCAAGGCACGGATAAGTAATATTAACCGACACTCTATCCA
AAGACCTCTCTTGGATGAGGCGCAACAGGCAATTGGCTGTGTTGCCATGGT
GGGGAGTTTGATATTTAAATTAGTGACACATTATGGAAATGGTCTAGATTAT
ATTAGACATTATACTACCACTCTCGCAGATTTACCTCTAGTATACGGAGACT
TGCTCGATTCACCTCGGTTTACCGAATGGTAGTGTGGAACAGATCATACGCCA
TTGTATGGCACCAAACCATATATAGATTACATCACAAATTC
```

**4). TPA\_exp: Suid herpesvirus 1.** GenBank: BK001744.1

CGGGGTCCAGCAGCGCCAGCACGCCCTGGTCCGTGCGCAGGGCGCCGCGCCA  
CGGTGCCCCGGGCGCAGCTCGCGCACGTACGCGTCCCCGTGCGCGAGGGCCG  
CGGAGACGCGCACCTCGACGGCCGTGCGCGGCGTGGCGTTGACCTCGCCA  
CGGGCACCAGCGCCGCCTCGTCCACGGCCCGCGCCGCTCGGGCGAACTGCT  
CGCGCAGCGTCGGGTTCTGGCGGTTCGTGGAAGAACTCGTCGGCGATCGTGA  
GGGCAAAGAGCGCGCGCGTCAGCGGCTTCAGGCCCTCGTTCTGCATCTGGC  
GCACCGCCAACGCCAGCGGCAGCGCCAGTTGGTGTGCTGCGCCACGTAGC  
GCAGGCCGTCTCGACAAAGTCCATGTCGTAGAGCGTCGCGAAGCGGGGCT  
GCACGAGCGCGCGCCGTCTGCT

**5). Gallid herpesvirus 2.** GenBank AF147806

TTTGAGATATTATTGCCCGTTCTAAACCTAATGCTTCTATAAAGTGGGAATC  
AGATTCGGAAATTACACAATTCTCCATATAATTGGATAAATATGTCATTCCG  
GGTCCGTAGCTTTCAATCAACCCAAAGACCACGTTACCGATGACGGCAACG  
CATCCAACCTACCTGTTGTACATCATCAAAAATATCACCTTCATCCACAGAGC  
CGTAATTTTCGTGTAAAATATGTTTTTAGTGCTGATTCATACGCACGGCATA  
CTGTCGTACAAACCCACGCTCTATAAGTGCCTCCAATAATTGTTTAGGAGAT  
GAACTGTATTGGATAGCATCCCAAGCCCGTCTGGCAGAATTGGAAAGTTTT  
GCTTTGGCCGCATCAATAGCACCGTTATCTTCCTCTAAACCAATGTCGGAAA  
TAAGTCTGAGTACAGCAGATAAAT

**6). Duck enteritis virus strain VAC.** GenBank: EU082088.2

TGGGATACAATACAACATAGCAATACGCCTCAACAAGTAATTGATGCACTA  
ATTTCTACGGGTTTTGTAGCACAAAATTGCCGTAATTATGAGGTGGCATTAA  
CCTCAATGTACTATAATTAACAATCGCGAGCTACTACCGATAATGGATATGC  
GCTAAATGATACCCAACAGGTGATAGGTTGTGTCTCTATGGTCGGAAATGTT  
GTGTTTGGTCTCATAGATAGCTACGGGCGCGATGCCGACTATATTGATGCAT  
ATGCAGAGGCGATGTCATCGCTCGAGTCTGACAGCGGCGATTTTCTTTCCGGC  
CATTGGTCTACCGAAAGGTGGAATTGAACAAACGATCCGCCATTGTATGGC  
ACCGCGGCAATAACAGACTATATACGTGCCGCACGCCAAGCGCTAGTACA  
AGAAATAGAACTGCGTCTAGTATATATA

**7). Bovine herpesvirus type 1.** GenBank: Z54206.1

TGGGACGCCGTGCAGGCGAGCGCCACGCCAGACCAAGCCGTGGAGACGCT  
GGCCGCGGCGGGGTTTACGCCGGAACGTGCGCCATGCTAGAGCGCGCCGT  
GCTGGCGCAGTATTAATAATTACAGATGGAAATCTATCGCGCCCAGAGCC  
GCGCGCGCCGGCAGACGTGCTGCAGGCGGTGGGCTGCGTGGCAGGTGGCGGG  
CGGCGTGCTGTTTAAACTCTTTGACGCGTACGGGCCAGTGCGGACTACCTC  
GCGCACTACACGGCCACTATCGCAAACCTGCACCCGTAACGCGGACGTG  
CTGCCGTTGCTGGGGCTGCCCCACGGCGGGCTGGAGCAGACGATCCGCCAC  
TGCATGGCCCCGCGGCCGCGCACGGACTACGTGGCGGCGATTTCGCGGGCG  
CTGGCGGCAGAGGCCGCGGCCGCGG

**8). Cercopithecine herpesvirus 16 strain X313 (mandril). GenBank: DQ149153**

CGACTAGCGCGCGGTCCGACTGCAGCCCCATCCACGTGTCGTGGAGCTCCC  
 GGACGAACTCGGCCACGCGCCGGGGACCCGTGGCGGCGCGGGCGGCGTGG  
 TAGGCGGCGGCCAGCCGCCAGCGCGCCAGGAAGTGCCCCATGAAGCA  
 GAACCCCGGCACGTGCTCCCCCGCCAGCAGCTTGGAGGCGCGGGCGTG  
 GATGCCCCCGGCGACCGTGACGAACGCGTGCACCTCGCGGAGGACGGCGGT  
 CATCACGTTGCCGTCGGGCGAGACCTGCGTCGCCAGCGCGTTCGACACCCC  
 CAGGTGGGCCATGGCCTCGGTGATCAGGCCCGCCAGGGCGGCCGTGAGGGC  
 GCGCTTGGCGTCGTGGTAGGTGCCGCAGTACCGACTGACCGCGTTCGGCCAT  
 GCGTCCGGGGCCAGGGCCCCAGGCGGTTCGGGGGCCTCCCCGACCACGGC  
 GTACA

**Resultados :**

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
1	AFA	430	2	CANINO	429	94
1	AFA	430	3	FELINO	404	63
1	AFA	430	4	CERDO	432	40
1	AFA	430	5	POLLO	448	47
1	AFA	430	6	PATO	414	53
2	AFA	430	7	BOVINO	405	49
1	AFA	430	8	MANDRIL	439	46