



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



IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA ANIDADA PARA LA
DETECCIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA TIMIDIN
KINASA DEL VIRUS HERPES FELINO

PAULINA JOSEFA MACÍAS SAGREDO

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

PROFESOR GUÍA
CARLOS NAVARRO VENEGAS

SANTIAGO, CHILE
2011



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



IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA ANIDADA PARA LA
DETECCIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA TIMIDIN
KINASA DEL VIRUS HERPES FELINO

PAULINA JOSEFA MACÍAS SAGREDO

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

NOTA FINAL:

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

SANTIAGO, CHILE
2011

MEMORIA DE TÍTULO

“IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA ANIDADA PARA LA DETECCIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA TIMIDIN KINASA DEL VIRUS HERPES FELINO”.

“IMPLEMENTATION OF A TECHNIQUE OF POLYMERASE CHAIN REACTION TO DETECT THE GEN OF THE THYMIDINE KINASE PROTEIN OF FELINE HERPESVIRUS”.

Paulina Josefa Macías Sagredo *

*Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera adueñarme de estas líneas para expresar mi aprecio y cariño infinitos a quienes me apoyaron todos estos años.

Quisiera comenzar por agradecer a mi amada familia el gigantesco esfuerzo que ha significado acompañarme con cada una de mis ideas locas, mis desafíos que tan tozudamente me he planteado desde hace años. Me han visto caer tantas veces y sin embargo siempre han estado ahí para curar aquellas heridas y seguir adelante. Nunca olviden que los adoro sobre todas las cosas.

A mi Felipe, mi amado Felipe. Quien más que tú es capaz de descifrarme absolutamente, soportarme y hasta entenderme.... ¡Entenderme! Gracias por acompañarme diariamente y zurcir esas alas que tantas veces se desvanecieron, una y otra vez...

A mi querido Profe Navarro, que me brindo la posibilidad de salirme con la mía y seguir alimentando mis sueños, trabajar en lo que me gusta y entregarme su conocimiento y bastas experiencias de vida. Gracias por su tiempo y su apoyo en todo este proceso cúlmine de la carrera.

A mis amigas de la vida, mis niñas, que conocen a la perfección lo más profundo de mí. Son parte fundamental de mi historia, no podría imaginarme mi vida sin haberlas conocido, y que sin importar el tiempo o la distancia, están.

A quienes supieron hacer de mis años de universidad un verdadero jolgorio, que me dieron esa luz necesaria para vencer cualquier cosa, y enseñaron a reírle a la vida. A mis grandes amigos.

A todas esas sonrisas que conocí y que me supieron llenar el alma con cosas tan simples.

Finalmente, agradezco infinitamente a mi Universidad de Chile y a todos los que la hacen ser tan grande como es, porque en todo lugar la calidad humana es siempre lo más importante.

RESUMEN

El virus herpes felino es uno de los principales agentes etiológicos involucrados en el Complejo Viral Felino. Posee distribución mundial y afecta a gatos domésticos provocando lesiones tanto oculares como del tracto respiratorio superior.

Su casuística en Chile es común, pese a ello su diagnóstico es sólo clínico, a diferencia de otros países donde se utilizan diversas técnicas para ello, siendo la reacción en cadena a la polimerasa (PCR) la más recomendada y con mejores resultados.

El objetivo de este estudio fue implementar un método diagnóstico molecular en Chile, para ello se seleccionaron gatos menores de un año con signología clínica sugerente de la infección con herpes felino, para la detección del gen de la proteína Timidin Kinasa del virus, altamente específico y conservado, mediante la técnica de PCR anidado y posterior determinación del porcentaje de identidad nucleotídica del amplificado obtenido respecto de la base de datos genómica GenBank®.

Como resultado se obtuvo una tasa de detección del 100% de las muestras y el control positivo, y una identidad nucleotídica de un 92 % comparado con la base de datos genómica del GenBank® (número de acceso E12463.1), probando que los amplificados corresponden al virus herpes felino.

De esta forma se logra implementar un método diagnóstico efectivo para ser utilizado en complementación al diagnóstico clínico.

Palabras Clave: Complejo viral felino, Herpes felino, PCR anidado, Timidin Kinasa, diagnóstico herpes felino.

ABSTRACT

Feline herpesvirus is a main etiological agent of feline respiratory complex. It has worldwide distribution and affect domestic cats causing ocular and upper respiratory tract lesions.

It has a common casuistry in Chile, nevertheless only clinical diagnostic is used, unlike use several techniques in other countries. PCR is the most recommended with best performing of them.

For the purpose of implemented a effective diagnostic method in our country, we select cats under one year-old with clinical signs suggest feline herpesvirus infection, to detect thymidin kinase protein gen of herpesvirus, highly specific and conserved, by a nested PCR and subsequent determination of nucleotide identity percentage respect GenBank®, genomic database.

As a result, we obtained a high detection rate (100 percent of samples and positive control), and a 92 percent of nucleotide identity in comparison with de genomic database GenBank® (accesion number E12463.1), proving that correspond to feline herpesvirus.

Thus achieved described an effective diagnostic method to be used as a complementation of clinical diagnostic.

Keywords: Feline herpesvirus, feline respiratory complex, nested PCR, thymidine kinase, feline herpesvirus diagnosis.

INTRODUCCIÓN

El virus herpes felino tipo 1 (VHF-1) fue aislado en 1957 por Crandell y Maurer (15). Es un virus DNA lineal de hebra doble que contiene aproximadamente 134 kilobases (kb), subdividido en componentes largos y cortos de 104 y 30 kb respectivamente (8), el cual está inmerso en una cápside de simetría icosaédrica constituida por 162 capsómeros. Rodeando la cápside se encuentra el tegumento, matriz amorfa que contiene proteínas globulares con actividad enzimática. Por fuera del tegumento se encuentra una envoltura lipoproteica pleomórfica que presenta espículas, muchas de las cuales son las responsables de inducir una respuesta inmune en el hospedador (7).

EL VHF-1 está ampliamente distribuido en el mundo, siendo seropositivos al virus aproximadamente un 90% de los gatos (12). Sólo se conoce un serotipo, el cual difiere en virulencia dependiendo de la cepa (16). En gatos adultos provoca alta morbilidad y baja mortalidad, en cambio en gatos pequeños puede generar una mortalidad de 60% (2).

EL VHF-1 pertenece al orden *Herpesvirales*, familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae* y género *Varicellovirus* (4). Los virus de esta subfamilia se caracterizan por ser altamente especie-específicos, tener un ciclo replicativo corto de 24 horas, lábiles al medio ambiente y a desinfectantes comunes, poseer un marcado tropismo a los epitelios (5) y generar latencia en tejido neural (14).

El gato doméstico es el principal hospedero de VHF-1. La vía de ingreso del virus es nasal, oral o conjuntival, causando necrosis epitelial multifocal, con infiltración neutrofílica e inflamación en conjuntivas, faringe, tráquea, bronquios hasta bronquiolos (16). Las lesiones son provocadas mediante dos mecanismos: directo, producto de la replicación viral que lleva a citólisis, e indirecto, mediante la acción de células inflamatorias (5). No hace viremia, excepto en neonatos o en cachorros hipotérmicos, ya que la replicación viral ocurre preferentemente a bajas temperaturas. La excreción viral comienza 24 horas después de producida la infección, y se mantiene por una a tres semanas, mientras que el cuadro clínico agudo resuelve dentro de 10 a 14 días en gatos inmunocompetentes (16).

Este virus hace latencia en el ganglio trigémino principalmente y un 80% de los gatos infectados se transforman en portadores de por vida (17). La reactivación del virus puede ser inducida experimentalmente mediante el tratamiento con glucocorticoides. Sin embargo, existen otros factores que pueden reactivar al virus mediante estrés como: traslado a un nuevo ambiente (18% de los casos), parto y lactancia (en un 40% de los casos) (16). De esta forma, los gatos pequeños adquieren el virus en forma muy temprana (*Conjuntivitis neonatorum*) (2). El desarrollo de la enfermedad depende del nivel de anticuerpos maternos que posean, los cuales proveen de inmunidad pasiva vía calostroal durante las primeras semanas de vida. Cuando se encuentran presentes altos niveles de anticuerpos, los gatitos son protegidos contra la enfermedad y desarrollan una infección subclínica que puede terminar haciéndose latente. Cuando no existen suficientes anticuerpos maternos, se desarrolla la enfermedad clínica. Desafortunadamente, la infección por herpes virus no brinda una respuesta inmune activa sólida, por lo que las hembras infectadas no siempre cuentan con anticuerpos adecuados. Por ello, la respuesta inmune protege contra la enfermedad, pero no contra la infección (16).

La prevalencia del virus puede oscilar entre 1-20% dependiendo del tamaño de la población de gatos. En gaterías los riesgos son mayores, producto de la alta densidad animal y las malas condiciones higiénicas (16).

Signos clínicos.

Los cuadros clínicos pueden dividirse en: **Cuadro agudo clásico:** muy severo en gatos menores de un año. Presentan fiebre, rinitis, conjuntivitis, úlceras corneales tanto superficiales como profundas, abundante secreción mucopurulenta, tanto nasal como ocular y estornudos recurrentes. Esto lleva a depresión y anorexia. **Cuadro agudo atípico:** presentan úlceras orales y nasales, dermatitis con lesiones costrosas o neumonía. **Cuadro crónico:** presentan queratitis estromal con edema corneal, vascularización, las úlceras corneales pueden evolucionar a secuestro corneal, ceguera o una rinosinusitis crónica con descarga nasal y estornudos de por vida (16).

Algunos gatos adultos pueden desarrollar lesiones producto de la reactivación viral, lo cual es llamado recrudescencia. Ellos pueden presentar signos clínicos asociados tanto a un cuadro agudo, como pueden progresar a un cuadro crónico (16).

Frecuentemente existe coinfección con *Calicivirus felino* y/o *Chlamydomphila felis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma sp*, *Staphylococcus sp*, o *E.coli*, causando un síndrome respiratorio felino multicausal (16).

Existen vacunas contra el VHF-1, pero se ha demostrado que no proveen completa protección en todos los gatos, especialmente en lugares con alta densidad animal, donde la carga viral es alta (14).

Diagnóstico

La infección primaria con VHF-1 es tan agresiva que el diagnóstico clínico resulta sencillo. En contraste, en adultos los signos clínicos en su fase crónica son leves y diversos, por lo que hace necesaria la identificación viral (1).

Entre los diagnósticos diferenciales de un individuo con rinosinusitis, se encuentran: virales (Herpes, Calicivirus), bacterianas (*Chlamydomphila felis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma sp*. como agente primario), micóticas (*Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus spp*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*), parasitarias (*Capillaria aerophila*, *Syngamus ierey*), cuerpos extraños, alergias, alteraciones dentales, pólipos, neoplasias (adenocarcinoma, por ejemplo), rinosinusitis linfoplasmocítica y trauma (11).

Similar es el caso de un gato con conjuntivitis, cuyos diagnósticos diferenciales son: virales (Herpes, Calicivirus, virus de Inmunodeficiencia felina, leucemia viral felina), bacterianas (*Chlamydomphila felis*, *Bartonella sp.*, *Mycoplasma sp.*), alergia alimentaria, atopia, traumáticas (alteraciones de las pestañas, factores irritantes, etc.) (1).

Existen diversos métodos diagnósticos tales como: aislamiento viral (AV), inmunofluorescencia indirecta (IFI), seroneutralización (SN), inmunoensayo asociado a enzimas (ELISA) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Comparado con éstos, el PCR es un 25% más sensible que el aislamiento viral a partir de raspados conjuntivales (14), presumiblemente por una inactivación de la infectividad viral debido a que la envoltura es fácilmente destruida por el transporte, congelación, enzimas o anticuerpos presentes en la saliva o lágrimas (2, 9). Además, no necesita que el virus se encuentre viable y sus resultados no son alterados por la utilización de colorantes vitales como fluoresceína (necesaria para diagnosticar úlceras corneales) (1). Desafortunadamente, se

desconoce si individuos vacunados contra HVF-1 arrojan falsos positivos al ser muestreados y sometidos a PCR. Un estudio desarrollado el año 2011 concluye que tras vacunar individuos sanos, tanto nasal como parenteralmente, se obtiene un bajo porcentaje de positivos al utilizar el método PCR. Sin embargo, se estudiaron sólo dos vacunas, por lo que son necesarias investigaciones futuras para aclarar esta interrogante (10). En cuanto a otras técnicas diagnósticas, como por ejemplo AV e IFI, tienen una alta sensibilidad en casos donde el cuadro clínico es agudo, no así en los crónicos o recrudescentes (2). Otra desventaja que posee IFI es ser una técnica muy subjetiva al depender de la experiencia del operador, y sin buenos resultados, debido a la baja cantidad de antígeno viral y a la interferencia por parte de la respuesta inmune, ya sea humoral o mediada por células inflamatorias, lo que aumenta la posibilidad de falsos negativos (18). Además, IFI, SN y AV son procedimientos que demandan un tiempo mayor y son costosos comparados con PCR (14).

Por estas razones, el PCR es el método de elección para la detección de VHF-1 (2). Se han utilizado variantes del PCR convencional: anidado o en tiempo real, siendo este último el más moderno y con la capacidad de proporcionar información adicional, por ejemplo: un alto número de copias sugiere replicación activa, en cambio, un bajo número indica una infección latente con VHF-1 (16). Las muestras utilizadas para realizar el PCR son diversas, y tienen en común el integrar diferentes tejidos donde VHF-1 hace latencia. Los principales sitios de detección son: ganglio trigémino, nervio óptico, bulbos olfatorio, cornea y turbinas nasales. Con menor frecuencia se detecta el virus en: glándulas salivares y lacrimales, cavidad oral, tonsilas y conjuntiva. Estos últimos son más utilizados ya que su extracción no es necesariamente *post-mortem*, sino mediante raspados, cepillados o hisopados de tejido (9).

La técnica más usada actualmente a nivel mundial amplifica un segmento del gen que codifica a la proteína Timidin Kinasa, el cual fue encontrado por *Nunberg* y colaboradores en el año 1989 (8). Éste tiene la característica de ser altamente divergente en su secuencia aminoacídica entre las diferentes especies de virus herpes, y extremadamente conservado entre los aislados de VHF-1 (8). En un comienzo, se utilizó el PCR convencional, logrando tasas de detección que van de un 25-30% (2, 9, 14). Posteriormente se comenzó a realizar un PCR anidado (2, 13) logrando así tasas de detección de un 54%. Se describe que éste es 10 veces más sensible que el PCR convencional (13).

Un estudio (6) comparó seis protocolos de PCR que utilizan el gen de la proteína Timidin Kinasa para la identificación de VHF-1 y analizó su tasa de detección viral frente a una población en estudio afectada por el virus (5). Como conclusión se desprende que el PCR que mejores resultados obtuvo -con una tasa de detección viral de un 89%- fue el publicado en el año 1997 por *Stiles* y colaboradores (13), que contempló un PCR anidado (n-PCR), es decir, utilizó dos pares de cebadores diferentes en reacciones secuenciales de amplificación. El primer par de cebadores amplifica un fragmento de DNA que luego es usado como molde en una segunda reacción. El par de cebadores usados en la segunda ronda de amplificación, verifica la especificidad del producto obtenido en el primer PCR y la transferencia del primer producto obtenido a una nueva mezcla de reacción, tiene el efecto útil de dilución de los posibles inhibidores que puedan existir en la muestra original (7).

El estudio de *Stiles* y colaboradores (13) se mantiene como referencia principal en esta Memoria de Título, para lograr la implementación de un PCR (en este caso anidado) que busca detectar el gen Timidin Kinasa del virus herpes felino, de forma de complementar el diagnóstico clínico del virus, ya que no existe actualmente una prueba diagnóstica molecular para este virus específico en Chile.

MATERIAL Y MÉTODOS

Esta investigación fue realizada en los Laboratorios de Virología y Microbiología del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile con financiamiento propio.

1. Toma de muestras.

Se utilizaron muestras provenientes de 11 gatos Doméstico de Pelo Corto menores de un año de edad, sin vacunaciones previas, los cuales fueron examinados y seleccionados por la Dra. Loreto Muñoz, especialista en Medicina de Felinos, que presentaron los signos clínicos de: conjuntivitis uni o bilateral, secreción nasal y ocular mucopurulenta, estornudos paroxísticos, blefarospasmo y/o úlcera corneal, típicos de la infección aguda por VHF-1. Posteriormente, se les realizó a cada uno de ellos un hisopado con un tórula estéril seca sobre la mucosa conjuntival ventral de uno o ambos ojos afectados. Las muestras se mantuvieron refrigeradas a 4°C por 3 semanas, para luego ser homogeneizado el contenido del hisopo en un tubo con 200 uL de agua libre de nucleadas (Winkler®), previamente numerado, mediante la utilización de un agitador de tubos Heidolph®. Como control positivo se utilizó la vacuna atenuada liofilizada triple felina Feligen® del Laboratorio Virbac, la cual se resuspendió en 500 uL del diluyente recomendado por el fabricante. Como control negativo se obtuvo un hisopado con una tórula estéril de cada ojo de un gato clínicamente libre de herpes felino desde pequeño y sin vacunaciones.

2. Detección del gen de la Timidin Kinasa (TK) en VHF-1 mediante n-PCR

a) PCR anidado: Para la implementación de esta técnica se empleó un termociclador Apollo (CLP, USA) de 96 pocillos de 0,2 mL y un protocolo que involucra temperaturas y tiempos para cada etapa, así como el número de ciclos necesarios para el gen a detectar.

Partidores: los partidores utilizados para detectar el gen Timidin Kinasa del VHF-1 en esta primera reacción (PCR1) amplifican un fragmento de 383 pares de bases (pb) (9) y fueron encargados a la empresa Bioscan® para su elaboración:

VHF-1	1	5' –GCATTTACATAGATGGTGCCT – 3'	(Nucleótidos 65 – 85)
VHF-1	2	5' –ATATCTTGCGAGTGGGAAACAG – 3'	(Nucleótidos 447 - 426)

En la segunda reacción (PCR2) se utilizó un segundo par de partidores para amplificar un segmento interno de DNA obtenido en el PCR1 y de tamaño de 224 pares de bases (13):

VHF-1	3	5' – CTTACTACTTCCCAGAACC – 3'	(Nucleótidos 152 – 170)
VHF-1	4	5' – GTTCCTCACATACAACTTTC – 3'	(Nucleótidos 376 – 359)

Mezcla de la reacción: Se utilizaron 15 uL del kit comercial 2X PCR Master Mix (*Taq* DNA polimerasa, MgCl₂ y los desoxiribonucleótidos trifostatos), 1 uL de muestra y 5 uL de cada partidore específico, en un volumen final de 26 uL.

b) Amplificación de DNA (13): Tanto la primera como la segunda reacción del PCR anidado (PCR1 y PCR2) se rigen mediante el mismo protocolo de amplificación: luego de la denaturación inicial a 94°C por 4 minutos, sigue una secuencia de PCR de 35 ciclos (denaturación: 94°C por 1 minuto; alineamiento: 55°C por 1 minuto; extensión: 72°C por 1 minuto). Posteriormente una etapa de elongación final a 72°C por 8 minutos.

c) Visualización de productos amplificados: Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Winkler ®) en buffer Tris-borato (90 Mm Tris-borato, 10 mM EDTA) como solvente. El producto de PCR se mezcló (6:1) con un producto comercial de carga, 6X Mass Ruler Loading Dye Solution (Fermentas®), que posee glicerol para dar densidad a la muestra y azul de bromofenol para chequear el progreso de la migración de las bandas de DNA. Una alícuota de 5 µL de esta mezcla fue depositada en el pocillo respectivo del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V por 45 minutos. Como marcador de tamaño molecular se utilizó un estándar que contiene fragmentos de DNA entre 100 y 1000 pb (Fermentas®). Luego de la electroforesis, el gel fue incubado en bromuro de etidio (0,5 µg/mL) (Fermelo®) durante 45 minutos y posteriormente colocado en un transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminator UVP ®) y fotografiado.

Medidas de bioseguridad. El trabajo de laboratorio fue realizado acorde a los niveles de bioseguridad establecidos para los laboratorios de microbiología y virología animal, tales

como uso de material limpio, correcta eliminación de desechos y la utilización de delantal cerrado, y guantes en el trabajo práctico. El proceso de visualización del producto amplificado involucra el uso de bromuro de etidio y un transiluminador de luz UV. Debido a esto, al momento de la visualizar el gel se utilizó una placa de acrílico y gafas con filtro UV. Posteriormente la eliminación del gel sumergido en bromuro de etidio contempló su incineración, pues el compuesto químico mencionado tiene –entre otras- propiedades mutagénicas.

3. Determinación de porcentaje de identidad nucleotídica respecto de datos del GenBank®.

Secuenciación. Luego de ser sometidas al primer PCR, dos muestras fueron enviadas al Centro de Secuenciación de la empresa Genytec según sus requerimientos, el cual realizó la purificación del amplificado. Las secuencias fueron realizadas utilizando el Kit Big Dye Terminator, de Applied Biosystems, y para su lectura se ocupó un equipo ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (especificaciones Genytec).

Análisis. Mediante el programa *online* de libre acceso ClustalW 2.2.012, las secuencias entregadas por Genytec se alinearon para lograr una secuencia consenso (PMS) que luego fue comparada con el fragmento de la Timidin Kinasa del virus herpes felino del GenBank® (número de acceso E12463.1), estableciendo así el porcentaje de identidad nucleotídica. A modo de comparación, los resultados de Genytec también fueron incorporados al Programa BLAST de acceso *online*.

RESULTADOS

PCR anidado.

Al realizar el PCR1 (Figura 1) se pudo observar que en 3 de las 13 muestras se visualizó un fragmento de DNA de un tamaño cercano a 400 pares de bases, logrando una banda visible en el gel nítida y ancha. Sin embargo, en el control positivo (vacuna) no se obtuvo una banda visible. En cambio, en los productos del PCR2 (Figura 2) se pudo observar en todas las muestras y control positivo un fragmento de DNA de tamaño molecular alrededor de 200 pares de bases, logrando una banda de diversa calidad de visualización. Estas muestras pueden ser diagnosticadas como positivas.

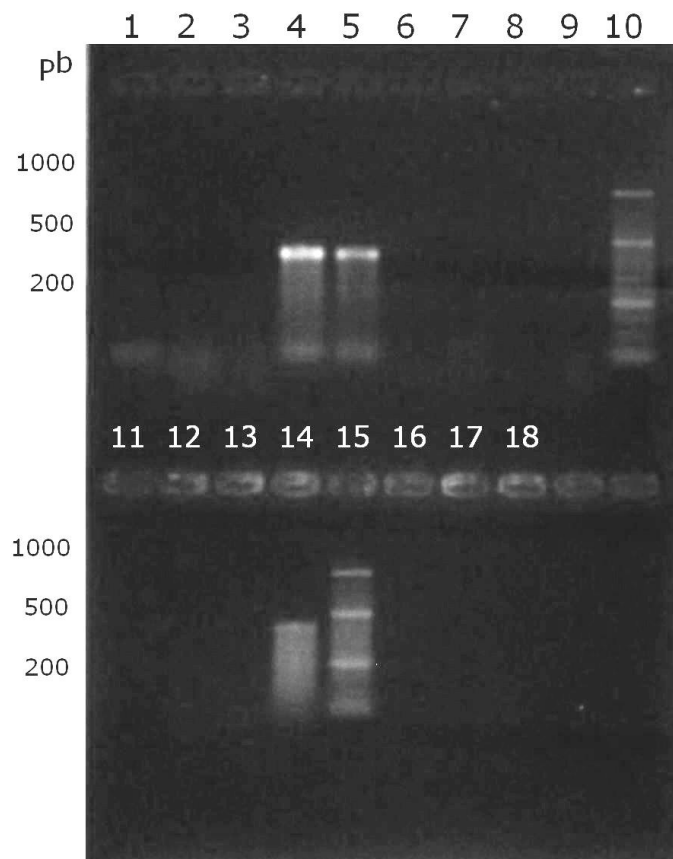


Figura 1. Detección del gen Timidin Kinasa mediante PCR anidado. Visualización de los resultados del PCR1. Carril 1-9: muestras 1-9, carril 10: marcador de tamaño molecular (50- 1000 pb, Fermentas ®), carril 11-14: muestras 10-13, carril 15: marcador de tamaño molecular, carril 16: control positivo (vacuna), carril 17 y 18: control negativo.

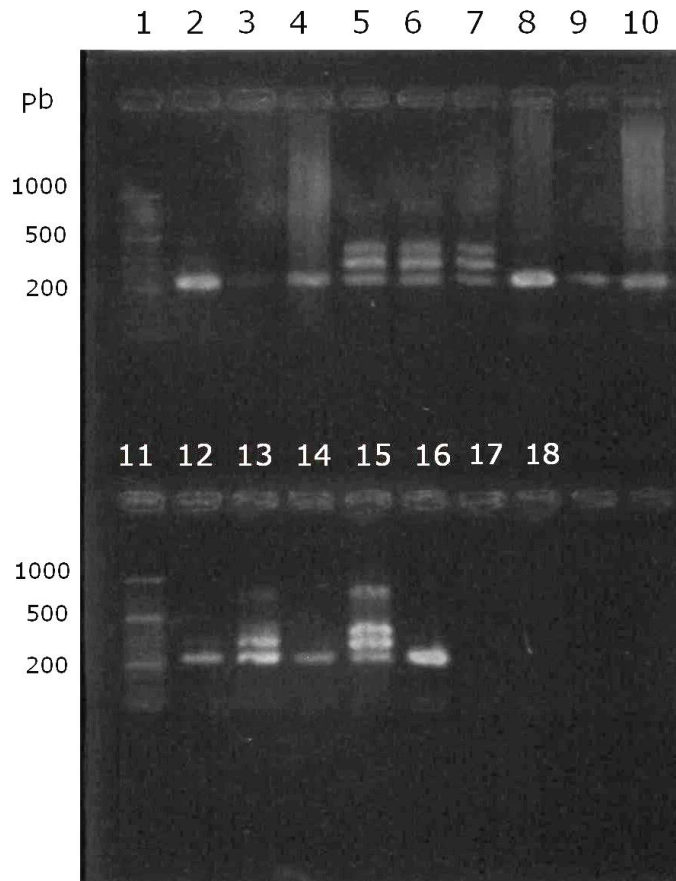


Figura 2. Detección del gen de la proteína Timidin Kinasa mediante PCR anidado. Visualización de los resultados de PCR2. Carril 1: Marcador de tamaño molecular (50-1000 pb Fermentas ®), carril 2-10: muestras 1-9, carril 11: marcador de tamaño molecular, carril 12-15: muestras 10-13, carril 16: control positivo (vacuna), carril 17-18: control negativo.

Análisis del fragmento secuenciado.

Los amplificados obtenidos fueron secuenciados con éxito (Anexo 1), logrando así 4 secuencias numeradas. Las secuencias 17 y 18 corresponden al amplificado de la primera muestra enviada, y 19 y 20 a la segunda enviada, considerando que cada amplicón corresponde a una hebra de DNA. Posteriormente, fueron alineadas para obtener una secuencia de consenso (PMS) (Anexo 2) y así comparar con los registros oficiales del GenBank®, resultando un 92% de identidad nucleotídica con el fragmento de 1.619 pb del gen de la proteína Timidin Kinasa del VHF-1. (Anexo 3). Adicionalmente, la secuencia consenso fue comparada con los datos del GenBank® para VHF-1 utilizando el programa BLAST (Anexo 4), obteniéndose un valor promedio de 96% de identidad nucleotídica.

DISCUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos en este estudio se pueden realizar las siguientes reflexiones:

Pese a que en el PCR1 hay solo 3 muestras positivas de 13, en el PCR2 la totalidad fueron positivas, por lo que se piensa que efectivamente hubo amplificación al utilizar los partidores 1 y 2 en el PCR1, pero debido a que luego del PCR1 las muestras y el control positivo presentaban baja cantidad de amplicones, no generaron una banda visible en el transiluminador UV. Los resultados del PCR2 se explican por la condición de ser un PCR anidado, donde en la segunda reacción se buscaba amplificar un segmento inmerso en el amplicón resultante del primer PCR, aumentando la sensibilidad y especificidad de la prueba.

Las muestras positivas en el PCR1 correspondieron a los individuos que se encontraban con signos clínicos severos, existiendo blefarospasmo en todos y epistaxis en la muestra 5, lo cual hace suponer que a mayor severidad de signos clínicos, mayor cantidad de virus excretado, lo que conlleva a una evidente visualización de la banda en el transiluminador UV. Como respaldo a esta premisa, en los resultados del PCR2 se observó que la muestra 1 y 2 (pertenecientes al mismo gato) fueron positivas, pero con diferencias en su nitidez. La banda visualizada en la muestra 1 se observó evidentemente más amplia y marcada que la muestra 2, la cual fue menos visible. Ésta fue obtenida del ojo derecho, que presentaba mayor severidad clínica respecto al ojo izquierdo, del cual fue obtenida la muestra número 2. Esta misma situación se repite en las muestras 11 y 12, pero de diferente gato. Esto explica que contando con 11 gatos en estudio, se obtuviesen 13 muestras.

Respecto a los resultados obtenidos en el PCR2, se pudo apreciar que los partidores utilizados son específicos, ya que en 8 de 13 muestras generaron una banda única de 224 pb. Cabe señalar que estas 8 muestras no presentaron bandas visibles tras la visualización en el transiluminador UV luego del PCR1. En cambio, en las 5 muestras restantes se observaron 3 bandas de diferente tamaño molecular, que tomando como referencia el marcador molecular, serían de aproximadamente 400, 300 y 200 pb. Las bandas de 400 y 200 pb corresponderían al amplicón obtenido en el PCR1 (383 pb) y al obtenido en el

PCR2 (224 pb) respectivamente. La aparición de una tercera banda de 300 pb se podría explicar porque las muestras que se utilizaron para el PCR2 correspondieron a la solución resultante posterior al PCR1, provocando que en la segunda reacción se encontraran los cuatro partidores utilizados, los cuales se rigen bajo el mismo protocolo de temperaturas en el termociclador, es decir, se unen de forma específica a una hebra molde al mismo tiempo, generando cuatro posibilidades de amplicones dependiendo de su asociación. Las combinaciones de partidores de acuerdo a la dirección de síntesis de nucleótidos (de 5' a 3') serían: 1-2 (383pb), 3-4 (224 pb), 1-4 (311 pb) y 2-3 (295 pb). Ya que las dos últimas poseerían un tamaño molecular similar, se explica que en el transiluminador UV se aprecien solo 3 bandas en lugar de 4.

Las cinco muestras en que se observaron las 3 bandas anteriormente descritas (3 de las cuales fueron las únicas positivas en el PCR1), corresponden a los gatos que se encontraban cursando con mayor severidad en sus signos clínicos comparativamente con el resto de los individuos del estudio. Suponiendo que estos gatos excretarían mayor cantidad de virus, la explicación a la aparición de las 3 bandas sólo en estos casos podría deberse a que al haber gran cantidad de DNA viral en una muestra y luego realizar el PCR, se visualicen todos los amplicones formados. En cambio cuando hay escaso DNA viral, se logra observar solo el segmento más amplificado en el transiluminador UV, correspondiente al obtenido gracias a los partidores 3 y 4, adicionados en la segunda reacción PCR. Por ello, se propone que en aquellas muestras que al hacer el PCR anidado se visualicen estas 3 bandas, se repita el PCR2, teniendo en consideración que en vez de utilizar 1 uL de muestra, se tomen 0,1 - 0,5 uL.

Es importante señalar que este fenómeno no se observa en ninguna de las muestras de la publicación que se toma como referencia en esta memoria (13). Una posible explicación podría deberse a las características de los gatos muestreados en ambos estudios, ya que en el presente sólo se seleccionaron gatos menores de un año. En cambio en el de *Stiles* y colaboradores (13), se consideraron felinos de todas las edades, principalmente adultos, cuyo cuadro clínico se caracterizó por menor severidad, y por ende menor excreción viral.

En relación a la alta tasa de detección, es importante señalar que 9 de los gatos muestreados (9 de 11) pertenecen al mismo refugio felino, en donde comparten desde hace

2 semanas una jaula de pequeño tamaño. Conociendo la alta morbilidad de VHF-1 hay una elevada posibilidad de que todos ellos se encuentren infectados.

En esta Memoria también se pudo determinar que, consecuentemente con los resultados obtenidos en un estudio reciente (3), tres semanas de refrigeración no influyen en la detección de VHF-1 mediante PCR, dado que todas las muestras analizadas resultaron positivas.

Comparado con otros protocolos de PCR a nivel mundial, el implementado en esta Memoria de Título alcanzó una alta tasa de detección. Un estudio realizado en la Universidad de California el año 2005 (6), comparó la “performance” (tasa de detección relativa, y el mínimo detectado por diluciones) de 6 protocolos PCR descritos por diferentes investigadores que tienen en común detectar el gen de la Timidin Kinasa, los cuales eran los más usados en los laboratorios. Se diferencian en el segmento específico a amplificar del gen, el tipo de PCR (convencional o anidado), los partidores, temperatura y número de ciclos en el termociclador. Los resultados muestran tasas de detección desde un 29 a un 86%. Cabe señalar que las muestras correspondieron a gatos sospechosos de VHF-1 y no se comprobó si efectivamente estaban infectados mediante otras pruebas diagnósticas, como el aislamiento viral. Entre los protocolos que entraron al estudio, se encuentra el publicado por *Reubel* y colaboradores (9) que utiliza el mismo protocolo de PCR y partidores del PCR1 de esta memoria de título, pero realiza solo un PCR convencional, obteniendo un 29% de tasa de detección. En otro estudio (13), se adicionó al PCR convencional de Reubel otro PCR sucesivo con partidores diferentes, es decir, realizó un PCR anidado, obteniendo una tasa de un 54% de detección. Años más tarde, fue replicado por otro investigador (5) el cual obtuvo un 86%, en contraste con el presente estudio que obtuvo un 100 % de tasa de detección. Los gatos que entraron a los diferentes estudios (6,13) tenían un amplio rango de edad (7 meses a 15 años) y fueron sospechosos de infección con VHF-1, tanto aguda como crónica. Estas variables son las que explicarían que pese a ser el mismo protocolo de PCR anidado, se obtienen tasas de detección diversas. Es por esto que en esta memoria de título se buscó minimizar estas variables, centrándose en la tasa de detección en individuos menores de un año que cursaban la infección aguda de VHF-1, por lo tanto, se propone en estudios posteriores detectar este virus en gatos adultos que estén cursando la fase crónica de la enfermedad, con la signología que se asocia a tal cuadro clínico.

El alto porcentaje de identidad nucleotídica obtenido demuestra que efectivamente el fragmento de DNA amplificado corresponde al gen de la proteína Timidin Kinasa del virus herpes felino, y no a otro virus herpes, pese a que se sabe que una de las características de la familia viral *Alphaherpesvirus* es ser altamente especie-específico.

CONCLUSIONES

En esta Memoria de Título se describe por primera vez en Chile el diagnóstico molecular del VHF-1 por la detección del gen de la proteína Timidin Kinasa mediante la técnica de PCR anidado, el cual posee una alta tasa de detección (100%) en gatos infectados menores de un año, los cuales se encuentran cursando el cuadro agudo.

El porcentaje de identidad nucleotídica obtenido de un 92% permite afirmar que el virus detectado corresponde al virus herpes felino.

BIBLIOGRAFÍA

1. **AROCH, I.; OFRI, O.; SUTTON, G. 2008.** Ocular manifestations of systemic diseases. En: MAGGS, D.; MILLER, P.; OFRI, R. Slatter's, fundamentals of veterinary ophthalmology. 4ª edición, United States, Editorial Saunders, pp.376-3.
2. **BURGESSER, K.; HOTALING, S.; SCHIEBEL, A. 1999.** Comparison of PCR, virus isolation and direct fluorescent antibody staining in the detection of naturally occurring feline herpesvirus infections. *J Vet Diagn Invest* 11: 122-126.
3. **CLARKE, H.; KADO-FONG, H.; MAGGS, D. 2006.** Effects of temperature and time in transit on polymerase chain reaction detection of feline herpesvirus DNA. *J Vet Diagn Invest* 18: 388-391
4. **DAVISON, A.; EBERLE, R.; EHLERS, B. 2009.** The order *Herpesvirales*. *Arch Virol*. 154: 171-177.
5. **MAGGS, D. 2001.** Update on the diagnosis and management of feline herpesvirus-1 infection. En: AUGUST, J. Consultations in Feline Internal Medicine. 4ª edición, United States, Editorial Saunders. pp.151-161.
6. **MAGGS, D.; CLARKE, H. 2005.** Relative sensitivity of the polymerase chain reaction assays used for detection of feline herpesvirus and commercial vaccines. *Am J Vet Res* 66: 1550-1555.
7. **MURPHY, F.; GIBBS, E.; HORZINEK, M.; STUDDERT, M. 2000** Veterinary Virology, 3ª edición, Academia Press, New York, United States, 629p.
8. **NUNBERG, J.; WRIGHT, D.; COLE, G. 1989.** Identification of the thymidine kinase gene of feline herpesvirus: use of degenerate oligonucleotides in the polymerase chain reaction to isolate herpesvirus gene homologs. *J Virol* 63: 3240-3249
9. **REUBEL, G.; RAMOS, R.; HICKMAN, M. 1993.** Detection of active and latent feline herpesvirus 1 infections using the polymerase chain reaction. *Arch Virol* 132: 409-420
10. **RUCH-GALLIE, R.; VEIR, J.; HAWLEY, J.; LAPPIN, M. 2011.** Results of molecular diagnostic assays targeting feline herpesvirus-1 and feline calicivirus in adult cats administered modified live vaccines. *J Felin Med Surg* 13: 541-545.
11. **RUIZ, R. 2005.** Enfermedades de los senos nasales en gatos. En: MONTOYA, J.A. Enfermedades respiratorias en pequeños animales. Editorial Inter-Medica, Buenos Aires, Argentina. Pp.89
12. **SANDMEYER, L.; WALDNER, C.; BAUER, B.; WEN, X.; BIENZLER, D. 2010.** Comparison of polymerase chain reaction tests for diagnosis of feline herpesvirus, *Chlamydia felis*, and *Mycoplasma spp.* infection in cats with ocular disease in Canada. *Can Vet J* 51: 629-633

13. **STILES, J.; MCDERMOTT, M.; WILLIS, M.** 1997. Comparison of nested polymerase chain reaction, virus isolation, and fluorescent antibody testing for identifying feline herpesvirus in cats with conjunctivitis. *Am J Vet Res* 58: 804-807
14. **SYKES, J.; BROWNING, G; ANDERSON, G.** 1997. Differential sensitivity of culture and the polymerase chain reaction for detection of feline herpesvirus 1 in vaccinated and unvaccinated cats. *Archiv Virol* 142: 65-74
15. **THAI, S.; NIKURA, M.; CHENG, H.; KRUGER, J. ; WISE, A. ; MAES, R.** 2010. Complete genomic sequence and an infectious BAC clone of feline herpesvirus-1. *Virology* 401: 215-227
16. **THIRY, E.; ADDIE, D.; BELÁK, S.** 2009. Feline herpesvirus infection: ABCD guidelines on prevention and Management. *J Feline Med Surg* 11: 547-555.
17. **WEIGLER, C.; BABINEAU, C.; SHERRY, B.** 1997. High sensitivity polymerase chain reaction assay for active and latent feline herpesvirus infections in domestic cats. *Vet Rec* 140: 335-338
18. **WESTERMEYER, H.; KADO-FONG, H.; MAGGS, D.** 2008. Effects of sampling instrument and processing technique on DNA yield and detection rate of feline herpesvirus-1 via polymerase chain reaction assay. *Am J Vet Res* 69: 811-817

ANEXO 1

Resultados secuenciación Genytec

17

CCTTTCTCGTCACAGGTCTAACGGCGAAGTACCTGGTAGAGCGGATGAAAATC
GACCGGGATATACTTACTACTTCCCAGAACCAATGCTATACTGGCGTAGTCTCT
TTGAAACTGATGTTGTCGGTGGTATCTATGCCGTCCAGGACCGGAAACGACGT
GGTGAATTATCAGCTGAAGATGCTGCCTATATCACCGCCCCTATCAATCATG
ATTTGCCGCACCATACTTCTTTTACATTCCAGACTATCCACAATAACAGGATA
TCAGAAAGTTGTATGTGAGGAACACCCCGACGTGACCCTAATCATAGATAGAC
ACCCTCTCGCCTCTCTGGTCTGTTTCCCCTCGCAAGAAAATATTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTAAGGGGGGGGGGGGGGGTGTTTTTTTTTTTTTCCCCCCCC

18

TCAGTGCACGCTGAATGCAGTCTATCTATGATAGGGTCCGTCGGGGTGTTCCTC
ACATACAACTTTCTGATATCCTGTTATTGTGGATAGTCTGGAATGTAAAAGAAG
GTATGGTGCAGCAAATCTTGCTTGATAGTGGGCGGTGATATAGGCAGCATCTT
CAGCTGATAATTCACCACGTCGTTTCCGGTCCCTGGACGGCATATTTTTCTACCG
ACAACATCAGTTTCAAAGAGACTACCCAGTATAGCATTGGTTCTGGGAAGTA
GTAAGTATATCCCGGTCGATTTTCATCCGCTCTGACCAGGTACTTCGCCGTTAA
ACTCTTACCTATTCCATAGGCACCATCTATGTAAATTGCATTTTTTATTTTTTT
TTTTTTGGGGGGGGGGGGGGGGTGGTGTTTTTTTTTTTTTCCCCCCCCCAT

19

ATGGTAAGGCAAGGGAATAACGGCGAAGTACCTGGTAGAGCGGATGAAAATC
GACCGGGATATACTTACTACTTCCCAGAACCAATGCTATACTGGCGTAGTCTCT
TTGAAACTTTTTTTGTCGGTGGTATCTATGCCGTCCAGGACCGGAAACGACGTG
GTGAATTATCAGCTGAAGATGCTGCCTATATCACCGCCCCTATCAAGCAAGA
TTTGCCGCACCATACTTCTTTTACATTCCAGACTATCCACAATAACAGGATAT
CAGAAAGTTGTATGTGAGGAACACCCCGACGTGACCCTAATCATAGATAGACA
CCCTCTCGCCTCTCTGGTCTGTTTCCCCTCGAAGAATATAATTTTATTTTTTT
TTTTTTGGGGGGGGGGGGGGGGTGTTTTTTTTTTTTT

20

ACACTACGACGAGAATGGAGTCTATCTATGATAGGGTCCGTCGGGGTGTTCCT
CACATACAACTTTCTGATATCCTGTTATTGTGGATAGTCTGGAATGTAAAAGAA
GGTATGGTGCAGCAAATCTTGAATGATAGCGGGCGGTGATATAGGCAGCATCT
TCAGCTGATAATTCACCACGTCGTTTCCGGTCCCTGGACGGCATATTTTTCTACC
GACAACATCAGTTTCAAAGAGACTACGCCAGTATAGCATTGGTTCTGGGAAGT
AGTAAGTATATCCCGGTCGATTTTCATCCGCTCTGACCAGGTACTTCGCCGTTA
AACTCTTACCTATTCCATAGGCACCATCTATGTAAATGCCTTTTTTTAATTTTT
TTTTTTTTTTGGGGGGGGGGGGGGGGTGTTTTTTTTTTTTTCC

ANEXO 2
Secuencia consenso

```

18      ATGGGGGGGGGGGAAAAAAAAACACCACCCCCCCCCCCCCCAAAAAAAAAAAAAAT--AAA 58
20      -----GGAAAAAAAAAAAAAAC-CCCCCCCCCCCCCAAAAAAAAAAAAAATTAATA 51
17      -----
19      -----
PMS     ATGGGGGG  GGAAAAAAAAAAAAAACACCACCCCCCCCCCCCCCAAAAAAAAAAAAAATTAATA

18      AAATGCAATTTACATAGATGGTGCCTATGGAATAGGTAAGAGTTTAAACGGCGAAGTACCT 118
20      AAAGGCATTTTACATAGATGGTGCCTATGGAATAGGTAAGAGTTTAAACGGCGAAGTACCT 111
17      ----CCTTTCTC-----GTCACAGGTCTAACGGCGAAGTACCT 34
19      -----ATGGTAA-----GGCAAGGGAATAACGGCGAAGTACCT 33
                               * * * *****

PMS     AAAGGCATTTTACATAGATGGTGCCTATGGAATAGGCAAGGTTTAAACGGCGAAGTACCT

18      GGTCAGAGCGGATGAAAATCGACCGGGATATACTTACTACTTCCCAGAACCAATGCTATA 178
20      GGTCAGAGCGGATGAAAATCGACCGGGATATACTTACTACTTCCCAGAACCAATGCTATA 171
17      GGT-AGAGCGGATGAAAATCGACCGGGATATACTTACTACTTCCCAGAACCAATGCTATA 93
19      GGT-AGAGCGGATGAAAATCGACCGGGATATACTTACTACTTCCCAGAACCAATGCTATA 92
      *** *****

PMS     GGTCAGAGCGGATGAAAATCGACCGGGATATACTTACTACTTCCCAGAACCAATGCTATA

18      CTGGGGTAGTCTCTTTGAAACTGATGTTGTTCGGTAGAAAAATATGCCGTCCAGGACCGGA 238
20      CTGGCGTAGTCTCTTTGAAACTGATGTTGTTCGGTAGAAAAATATGCCGTCCAGGACCGGA 231
17      CTGGCGTAGTCTCTTTGAAACTGATGTTGTTCGGTGGTATC-TATGCCGTCCAGGACCGGA 152
19      CTGGCGTAGTCTCTTTGAAACTTTTGTTCGGTGGTATC-TATGCCGTCCAGGACCGGA 151
      **** ***** * ***** * * *****

PMS     CTGGCGTAGTCTCTTTGAAACTGATGTTGTTCGGTGGTATCATATGCCGTCCAGGACCGGA

18      AACGACGTGGTGAATTATCAGCTGAAGATGCTGCCTATATCACCGCCCACTATCAAGCAA 298
20      AACGACGTGGTGAATTATCAGCTGAAGATGCTGCCTATATCACCGCCCGCTATCATTCOA 291
17      AACGACGTGGTGAATTATCAGCTGAAGATGCTGCCTATATCACCGCCCACTATCAATCAT 212
19      AACGACGTGGTGAATTATCAGCTGAAGATGCTGCCTATATCACCGCCCACTATCAAGCAA 211
      ***** *****

PMS     AACGACGTGGTGAATTATCAGCTGAAGATGCTGCCTATATCACCGCCCACTATCAAGCAA

18      GATTTGCCGCACCATACCTTCTTTTACATTCCAGACTATCCACAATAACAGGATATCAGA 358
20      GATTTGCCGCACCATACCTTCTTTTACATTCCAGACTATCCACAATAACAGGATATCAGA 351
17      GATTTGCCGCACCATACCTTCTTTTACATTCCAGACTATCCACAATAACAGGATATCAGA 272
19      GATTTGCCGCACCATACCTTCTTTTACATTCCAGACTATCCACAATAACAGGATATCAGA 271
      ***** *****

PMS     GATTTGCCGCACCATACCTTCTTTTACATTCCAGACTATCCACAATAACAGGATATCAGA

18      AAGTTGTATGTGAGGAACACCCCGACG-GACCCTA-TCATAGATAGACTGCATTCCAGTC 416
20      AAGTTGTATGTGAGGAACACCCCGACG-GACCCTA-TCATAGATAGACTCCATTCTCGTC 409
17      AAGTTGTATGTGAGGAACACCCCGACGTGACCCTAATCATAGATAGACACC-CTCTCGCC 331
19      AAGTTGTATGTGAGGAACACCCCGACGTGACCCTAATCATAGATAGACACC-CTCTCGCC 330
      ***** ***** ***** * * * *

PMS     AAGTTGTATGTGAGGAACACCCCGACGTGACCCTAATCATAGATAGACACCCTCTCGCC

18      GCACTGA----- 423
20      GTAGTGT----- 416
17      TCTCTGGTCTGTTTCCCACTCGCAAGAAAATATTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGGGG 391
19      TCTCTGGTCTGTTTCCCACTCG-AAGAAATAAATTTATTTTTTTTTTTTTTTT---GGGG 386
      **

PMS     TCTCTGGTCTGTTTCCCACTCGCAAGAAAATATTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGGGG

18      -----
20      -----
17      GGGGGGGGGTGTTTTTTTTTTTTCCCCCCCC 424
19      GGGGGGGGGTGTTTTTTTTTTTA----- 409
PMS     GGGGGGGGGTGTTTTTTTTTTTTCCCCCCCC

```

ANEXO 3

Alineamiento de la secuencia Consenso PMS con el gen de la Timidin Kinasa del GenBank®. Los asteriscos muestran los sitios de homología entre ambas secuencias.

```

PMS          -----AAAAAAAA 49
Thymidine    TCACGTTTCATCATAACAGATCAGACGATGGCGAGTGGAAACCATCCCCGTTTCAGAAATGA 300
                                     * * * *

PMS          AAAAAATTAaaaaaa----AGGC--AT-----TTTACATAGATGGTGCCTATGGAAT 93
Thymidine    AGAGATTATTAaaATCACAGGTGAATACTGTCCGCATTTACATAGATGGTGCCTATGGAAT 360
* * ****   ***   ***   **   *****

PMS          AGGCAAGGGTTTAAACGGCGAAGTACCTGGTCAGAGCGGATGAAAATCGACCGGGATATAC 153
Thymidine    AGGTAAGAGTTTAAACGGCGAAGTACCTGGTCAGAGCGGATGAAAATCGACCGGGATATAC 420
*** * * *****

PMS          TTACTACTTCCCAGAACCAATGCTATACTGGCGTAGTCTCTTTGAAACTGATGTTGTCCG 213
Thymidine    TTACTACTTCCCAGAACCAATGCTATACTGGCGTAGTCTCTTTGAAACTGATGTTGTCCG 480
*****

PMS          TGGTATCATATGCCGTCCAGGACCGGAAACGACGTGGTGAATTATCAGCTGAAGATGCTG 273
Thymidine    TGGTATC-TATGCCGTCCAGGACCGGAAACGACGTGGTGAATTATCAGCTGAAGATGCTG 539
*****

PMS          CCTATATCACCGCCCACTATCAAGCAAGATTTGCCGCACCATACTTCTTTTACATTCCA 333
Thymidine    CCTATATCACCGCCCACTATCAAGCAAGATTTGCCGCACCATACTTCTTTTACATTCCA 599
*****

PMS          GACTATCCACAATAACAGGATATCAGAAAAGTTGTATGTGAGGAACACCCCGACGTGACCC 393
Thymidine    GACTATCCACAATAACAGGATATCAGAAAAGTTGTATGTGAGGAACACCCCGACGTGACCC 659
*****

PMS          TAATCATAGATAGACACCACTCTCGCCTCTCTGGTCTGTTTCCCACTCGCAAGA----- 447
Thymidine    TAATCATAGATAGACACC-CTCTCGCCTCTCTGGTCTGTTTCCCACTCGCAAGATATTTT 718
*****
    
```

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	PMS	513	2	Thymidine	1619	92

ANEXO 4

Identidad Nucleotídica de la secuencia Consenso (PMS) obtenida usando el programa de alineamiento BLAST®

Align.	DB:ID	Source	Length	Score	Identities
<input checked="" type="checkbox"/> 1	SP:KITH_FHV1	Thymidine kinase OS=Feline herpesvirus 1 GN=TK PE=3 SV=1 <i>Cross-references and related information in:</i> ▶ Nucleotide Sequences ▶ Ontologies ▶ Enzymes ▶ Protein Families ▶ Literature	343	559	96.0
<input checked="" type="checkbox"/> 2	TR:D1FXV9_FHV1	Thymidine kinase OS=Feline herpesvirus 1 GN=UL23 PE=4 SV=1 <i>Cross-references and related information in:</i> ▶ Nucleotide Sequences ▶ Ontologies ▶ Protein Families ▶ Literature	343	559	96.0
<input checked="" type="checkbox"/> 3	SP:KITH_EHV4	Thymidine kinase OS=Equine herpesvirus 4 (strain 1942) GN=TK PE=1 SV=1 <i>Cross-references and related information in:</i> ▶ Nucleotide Sequences ▶ Ontologies ▶ Enzymes ▶ Protein Families ▶ Literature ▶ Macromolecular Structures	352	320	59.0
<input checked="" type="checkbox"/> 10	TR:Q90020_9ALPH	Thymidine kinase OS=Canid herpesvirus 1 PE=4 SV=1 <i>Cross-references and related information in:</i> ▶ Nucleotide Sequences ▶ Ontologies ▶ Enzymes ▶ Protein Families ▶ Literature	328	300	56.0
<input checked="" type="checkbox"/> 11	TR:Q96697_9ALPH	Thymidine kinase OS=Canid herpesvirus 1 PE=4 SV=1 <i>Cross-references and related information in:</i> ▶ Nucleotide Sequences ▶ Ontologies ▶ Protein Families ▶ Literature	328	299	56.0
<input checked="" type="checkbox"/> 13	SP:KITH_SUHVN	Thymidine kinase OS=Suid herpesvirus 1 (strain NIA-3) GN=TK PE=3 SV=1 <i>Cross-references and related information in:</i> ▶ Nucleotide Sequences ▶ Ontologies ▶ Enzymes ▶ Protein Families ▶ Literature	320	292	57.0
<input checked="" type="checkbox"/> 14	TR:Q9QCQ3_9ALPH	Thymidine kinase OS=Suid herpesvirus 1 PE=4 SV=1 <i>Cross-references and related information in:</i> ▶ Nucleotide Sequences ▶ Ontologies ▶ Protein Families	297	289	56.0