



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

DETECCIÓN DEL GEN DE LA GLICOPROTEÍNA B
DEL VIRUS HERPES CANINO MEDIANTE LA REACCIÓN
EN CADENA DE LA POLIMERASA, VARIANTE MULTIPLEX

DETECTION OF CANINE HERPES VIRUS GLYCOPROTEIN B
GENE BY MULTIPLEX POLIMERASE CHAIN REACTION

Carolina Alejandra Valenzuela Parra

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

PROFESOR GUÍA
CARLOS NAVARRO VENEGAS

SANTIAGO, CHILE
2013



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

DETECCIÓN DEL GEN DE LA GLICOPROTEÍNA B
DEL VIRUS HERPES CANINO MEDIANTE LA REACCIÓN
EN CADENA DE LA POLIMERASA, VARIANTE MULTIPLEX

DETECTION OF CANINE HERPES VIRUS GLYCOPROTEIN B
GENE BY MULTIPLEX POLIMERASE CHAIN REACTION

Carolina Alejandra Valenzuela Parra

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : CARLOS NAVARRO V.	
PROFESOR CONSEJERO : JOSÉ PIZARRO L.
PROFESOR CONSEJERO : HÉCTOR ADARMES A.

SANTIAGO, CHILE
2013

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dedicar mis más sinceros agradecimientos a todos los que colaboraron conmigo en la finalización de esta etapa mi formación en la Universidad de Chile; que finaliza con el término de mi memoria de título y mi examen. Primero que todo, a mi familia que siempre estuvo junto a mí durante mi carrera; apoyándome y entregándome cariño y afecto para superar los problemas que se presentaban.

En segundo lugar a mi profesor guía Sr. Carlos Navarro; por haberme dado la oportunidad de ingresar al grupo de trabajo que comenzó algunos años atrás en el 2010; además de su apoyo incondicional en todas las etapas de la preparación, ejecución y finalización de esta memoria y su buena disposición al responder mis dudas y consultas. Al mismo tiempo a la Dra. María Antonieta Jara que siempre me entregó buenos consejos y apoyo en los momentos en que me encontraba un poco preocupada y distraída.

Por último agradezco a todas mis amistades generadas durante mis años en la Universidad, en Mundo Granja y en mi trabajo durante estos últimos años para todos ellos y ellas; muchas gracias por su apoyo y confianza en mis conocimientos, capacidades y habilidades para llegar a término esta etapa de mi vida.

RESUMEN

Los virus siempre necesitarán de la maquinaria metabólica de la célula infectada para replicar su material genético, produciendo numerosas copias del virus original. En dicho proceso, algunos virus poseen la capacidad de producir un efecto citopático denominado lisis celular. Dentro de los virus que producen este efecto se encuentran los virus Herpes, descritos en insectos, reptiles, anfibios y moluscos; como también en casi todas las especies de aves y mamíferos que se han investigado.

Uno de los virus de interés veterinario es el Herpes Canino Tipo 1 (CaHV1), debido a que su persistencia en un criadero canino provoca pérdidas económicas considerables, que incluso pueden significar el cierre de este tipo de empresas. El CaHV1 provoca una alta cantidad de cuadros clínicos, en especial en cachorros menores de cuatro semanas, en donde se ha descrito una mortalidad cercana al 90% de la camada. Si bien en Chile su detección y caracterización biológica fue descrita hace algunos años, obteniéndose un aislado nativo denominado RP5, lamentablemente aún no existe un método diagnóstico rápido.

Bajo este contexto, el objetivo de este estudio fue la detección simultánea de dos fragmentos del gen de la glicoproteína B del CaHV1 en un mismo PCR (variante múltiplex) a partir del aislado RP5. Así, al determinar las temperaturas y tiempos óptimos para las etapas de alineamiento y elongación, se pudo implementar una herramienta de diagnóstico molecular que podría ser utilizada y comparada con otros protocolos de PCR, que actualmente se están desarrollando en otras memorias de Título en la Unidad de Virología de nuestra Facultad.

Palabras clave: herpes virus canino, PCR múltiple, diagnóstico molecular.

SUMMARY

Viruses will always need the metabolic machinery of the infected cell in order to replicate its genetic material and produce multiple copies of the original virus. In this process, some viruses have the capacity to produce a cytopathic event called cellular lysis. Among the viruses that produce this effect we can find Herpes virus, described in insects, reptiles, amphibians, and mollusks; as well as almost all bird and mammal species ever investigated.

One of the virus of veterinary interest is Canine Herpes Virus Type 1 (CaHV1), due to its persistence in canine kennels it creates considerable economic losses, that can produce the shutdown of these kinds of businesses. CaHV1 causes a high number of clinical cases, especially in puppies younger than four weeks old, where a mortality rate of 90% has been described. Even though in Chile its detection and biological characterization was made a few years ago, obtaining a native isolate named RP5, a quick detection method does not exist.

Due to this, the objective of this study was the simultaneous detection of two fragments of the CaHV1 glycoprotein B gene in the same PCR (multiplex variant) from the RP5 isolate. Thus, by establishing the optimal times for elongation and alignment, a tool of molecular diagnostic was implemented, and could be used and compared with other PCR protocols that are currently being developed in other thesis in the Virology Laboratory of our Faculty.

Keywords: canine herpes virus, multiplex PCR, molecular diagnostic.

INTRODUCCION

El virus Herpes Canino Tipo 1 (CaHV1), fue descrito por primera vez en Estados Unidos de Norteamérica como el agente causal de una enfermedad septicémica mortal en cachorros menores de 4 semanas (3). En perros adultos provoca infección de la mucosa externa del aparato genital causando, entre otros síntomas, una leve vaginitis vesicular; además es uno de los causantes del síndrome respiratorio denominado “tos de las perreras”, que corresponde a una traqueobronquitis(5).

El CaHV1 se ubica en el Orden *Herpesvirales*, Familia *Herpesviridae*, Subfamilia *Alphaherpesvirinae*, Género *Varicellovirus*(11).La Familia *Herpesviridae* está compuesta por un gran número de virus que actúan como agentes infecciosos en diversas enfermedades, tanto en humanos como animales (14) y está conformada por cuatro subfamilias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, *Gammaherpesvirinae* y una cuarta que aún no recibe nombre (11). La división en subfamilias obedeció inicialmente a diferencias observadas en las características biológicas de sus integrantes. Sin embargo, actualmente se han considerado antecedentes moleculares que incluyen la secuencia genómica y el análisis filogenético (17).

A la subfamilia *Alphaherpesvirinae* pertenecen viriones de propagación rápida y que realizan ciclos líticos en las células infectadas, poseen un amplio rango de hospederos y producen infecciones latentes, especialmente en los ganglios sensoriales (2). Este fenómeno de latencia en el hospedador puede perdurar largos períodos de tiempo para luego activarse, por ejemplo en condiciones de estrés (14). Se han descrito cinco géneros: *Iltovirus*, *Mardivirus*, *Simplexvirus*, *Varicellovirus* y un quinto que todavía no recibe nombre (11). Cabe destacar que al género *Varicellovirus* pertenecen la mayoría de los herpesvirus con importancia veterinaria (5).

Los virus Herpes poseen un genoma ADN, cuya molécula lineal de hebra doble alcanza un tamaño que varía entre 125 y 235 mil pares de bases (pb). Este genoma se encuentra rodeado por una cápside de simetría icosaédrica de aproximadamente 125nm. Rodeando a la cápside, se ubica una estructura fibrosa proteica denominada tegumento y una envoltura lipídica con proyecciones distribuidas sobre la superficie. El tamaño final de la partícula viral varía entre 120 y 300nm(14;5).

La alta fragilidad del virión está en relación directa con la presencia de una envoltura glicoproteica y lipídica, que puede ser fácilmente destruida por el calor, los rayos ultravioletas, los solventes lipídicos y los desinfectantes comunes (17). La multiplicación del virión es óptima entre 32 y 33°C, a esa temperatura se aprecia una replicación rápida

con lisis de las células infectadas, sin embargo, se inactiva fácilmente a temperaturas superiores a 40°C (8).

La replicación de un virus Herpes implica un proceso conformado por 5 etapas: adsorción, penetración, síntesis de ácido nucleico y proteínas, ensamblaje y finalmente liberación (lisis) (17; 14). La adsorción es altamente específica; en esta etapa las proteínas del virus interactúan con receptores de la célula, que determinarán cuáles células serán susceptibles de ser infectadas. Para que la replicación sea efectiva deben sintetizarse nuevas copias del genoma viral, además de la síntesis de proteínas específicas del virus. Por lo tanto, la fijación e incluso la penetración a una célula susceptible, no garantiza la multiplicación viral (14). Durante la replicación se pueden generar tres clases de RNAm: el temprano inmediato (α) que codifica cinco proteínas reguladoras; el temprano retardado (β) que codifica proteínas relacionadas con la replicación del ADN, incluyendo la timidinkinasa, y el tardío (γ) que codifica proteínas estructurales de la partícula viral. Las proteínas que han sido sintetizadas se clasifican en dos categorías: proteínas tempranas, las cuáles se sintetizan inmediatamente después de la infección y son requeridas para la replicación del ácido nucleico viral; y las proteínas tardías, sintetizadas más tarde e incluyen las glicoproteínas de la cubierta viral (17;14).

En cachorros, el CaHV1 provoca una enfermedad breve y severa, que se caracteriza por una viremia y una mortalidad del 80% en animales menores a una semana. Los animales sobrevivientes quedan con secuelas cerebelosas y articulares irreversibles. En los cachorros se observa dos formas de presentación: una forma superaguda caracterizada por una mortalidad fulminante de tipo asintomática y, otra aguda (la más habitual) que cursa inicialmente con trastornos digestivos, anorexia, heces líquidas de color grisáceo, vómitos y quejidos continuos por dolor abdominal; luego aparecen síntomas nerviosos de encefalomiелitis seguidos de coma y muerte (17; 8). Por otra parte, uno de los facilitadores de la transmisión viral es el contacto estrecho entre los individuos, ya sea a través del contacto por mucosas durante el coito, lamidos y caricias de las madres (17;8;5).

Actualmente, la herpesvirosis canina se distribuye a nivel mundial y su potencial patogénico está relacionado a la edad de los animales infectados. Esta enfermedad se puede presentar en muchos alberges y hoteles caninos, estabularios y principalmente en criaderos, en los cuales la seroprevalencia superaría el 90%. En estos lugares, la mitad de los animales seropositivos presentarían trastornos reproductivos. Existen casos de herpesvirosis endémicas en criaderos en los que se han presentado casos de mortalidad neonatal; mientras que en cachorros de más edad y en adultos se presentan distintos signos patológicos, tales como afecciones oculares y rinofaríngeas que se manifiesta

clínicamente como “tos de las perreras”. En las hembras se presenta una leve vaginitis vesicular, además las infecciones uterinas pueden derivar en un aborto, malas pariciones e incluso infertilidad (7; 8; 5).

Métodos Diagnósticos. Este tipo de herpesvirosis podría detectarse clínicamente en un criadero cuando se presentan casos masivos de mortalidad perinatal, seguidos de abortos, infertilidad y cuadros de tos de las perreras (1;18). En la necropsia, se observan petequias hemorrágicas en hígado, bazo, pulmones y riñones, que corresponden a lesiones características. Mientras que, a partir de cortes de tejido afectado por el virus, se podría realizar un diagnóstico rápido mediante inmunofluorescencia. Sin embargo, los cuerpos de inclusión intranucleares visibles a nivel histológico son las lesiones patognomónicas de esta herpesvirosis(13;18)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Si bien, el aislamiento viral del CaHV1 en cultivos celulares es sin duda la prueba estándar de excelencia, lamentablemente demora al menos un mes. Por lo cual, actualmente se ha implementado su detección molecular mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnica ampliamente usado en el área de la biología molecular (16).

Este método para detectar ácidos nucleicos consiste en tres pasos sucesivos que en conjunto forman un ciclo: 1. *Desnaturación:* se somete el ADN a altas temperaturas (94-95°C) logrando la separación de las hebras. 2. *Alineación:* el ADN es enfriado (48-58°C), los oligonucleótidos sintéticos (cebadores) se unen a sitios cercanos a la región que será amplificada. 3. *Elongación:* se realiza a temperatura intermedia (72°C), los oligonucleótidos de la mezcla son incorporados al producto de extensión por la ADN polimerasa termoestable. Estos tres pasos se repiten 30 o más veces con el fin de obtener millones de copias del segmento de ADN de interés, son ciclos repetidos que llevan a una síntesis exponencial de copias, lo que le otorga a la técnica una gran sensibilidad y especificidad (17), capaz de detectar parte del genoma del patógeno de interés, a partir de ADN viral presente en órganos y tejidos afectados (9; 20; 8; 5).

PCR multiplex: Corresponde a una variante del PCR que permite la amplificación simultánea de varias secuencias de interés en una misma reacción, utilizando más de un par de cebadores. Por lo tanto, esta variante resulta más rigurosa y exigente, manteniendo las características de sensibilidad y especificidad descritas previamente (6).

Situación en Chile. El primer hallazgo del CaHV1 se remonta al año 1992, cuando su presencia fue sugerida en base a la muerte perinatal de algunos cachorros que evidenciaron la presencia de petequias en órganos como hígado y riñón, además de una gran cantidad de cuerpos de inclusión intranucleares eosinófilos. Se observó el efecto citopático característico de este virus en los cultivos de la línea celular de riñón equino ocupado en ese estudio (13). Luego se detectó y caracterizó biológicamente un aislado nacional denominado RP5 (18). Desde entonces, no existen otros informes respecto de alguna otra caracterización viral ni de alguna herramienta diagnóstica al respecto.

Con estos antecedentes, en esta Memoria de Título se realizó la detección simultánea de dos fragmentos del gen que codifica una glicoproteína propia de CaHV1: la glicoproteína B (gB). El gen de la gB (ver anexo 1) consta de 2640pb y los fragmentos utilizados en este estudio constan de 450 y 1286 pb. (19)

Esta glicoproteína facilita el ingreso a la célula blanco en las infecciones producidas por viriones libres o en la infección debido a la diseminación célula a célula (15). Esto contribuirá a la confirmación molecular de la presencia del CaHV1 en Chile y además, en conjunto con otras dos Memorias de Título paralelas que contemplan distintas variantes del PCR (anidado y convencional), permitirán implementar este procedimiento como técnica diagnóstica rápida y útil para el control de esta enfermedad en Chile.

MATERIAL Y MÉTODOS

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

Aislado viral: El virus utilizado en esta memoria fue el aislado nacional RP5 (sobrenadante de cultivo celular infectado) mantenido a -20°C en el laboratorio de la Unidad de Virología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Como controles negativos se incluyó DNA de *S. enteritidis* y DNAc del virus distemper canino y como control de reactivos se utilizó agua libre de nucleasas (ALN).

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

Cebadores a utilizar en el PCR múltiplex (PCR 3): se utilizaron dos pares de cebadores diseñados (9;20) para amplificar por separado 2 fragmentos del gen de la gB (PCR1 y PCR2), encargados a la empresa BIOSCAN para su elaboración:

PCR1: (9)

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

PCR2: (20)

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

Mezcla de la reacción: Se utilizó un kit comercial (2X PCR Master Mix; Fermentas®), que contiene la polimerasa termoestable, los desoxinucleótido trifosfatos (dNTPs), el buffer de reacción y MgCl₂. En un tubo Eppendorf de 0.2mL se adicionó 25µL del Master Mix, 5µL de cada uno de los cebadores y 5µL de la muestra de ADN, obteniendo un volumen total de 50µL.

Amplificación del ADN: Para la determinación de la temperatura óptima de alineamiento de los partidores utilizados, se utilizó un termociclador de gradiente de temperaturas (Px2 ThermalCycler, ThermoElectron Corporation), facilitado por el Dr. Pedro Smith, del Departamento de Patología Animal de nuestra Facultad, que permitió realizar la etapa de alineamiento a una temperatura conocida e individual por cada columna de pocillos del termociclador. Así, el protocolo del PCR utilizado contempló una desnaturación inicial a 94°C por 2 minutos y luego 35 ciclos que incluyeron la desnaturación a 94°C por 60 segundos, alineamiento por 60 segundos y la extensión a 72°C por 60 segundos. Finalmente, la elongación final a 72°C durante 10 minutos. El intervalo de temperaturas consideró doce grados (40°C → 51°C). (*)

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Nº Ciclos
Desnaturación inicial	94	120	1
Desnaturación	94	60	35
Alineamiento	40 – 51(*)	60	
Elongación	72	90	
Elongación final	72	600	1

(9 ; 20)

Visualización de productos amplificados. Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Winkler ®) en buffer Tris-borato (90Mm Tris-borato, 10mM EDTA) como solvente. El producto de PCR se mezcló (6:1) con un producto comercial de carga (6X MassRulerLoadingDyeSolution, Fermentas ®), que posee glicerol y azul de bromofenol para chequear el progreso de la migración de las bandas de ADN. Posteriormente, se depositó una alícuota de 5 µL de esta mezcla en el pocillo respectivo del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 100V por 40 minutos. Como marcador de tamaño molecular se utilizó un estándar que contiene fragmentos de ADN entre 100 y 2000pb (HyperLadder II, Biorline ®). Luego de la electroforesis, el gel se sometió a incubación en bromuro de etidio (0,5 µg/mL) (Fermelo ®) y posteriormente se colocó en un transiluminador de luz ultravioleta (TransiluminatorUVP ®) donde fue fotografiado.

Análisis de resultados: La determinación de las temperaturas y tiempos óptimos de alineamiento y elongación del PCR múltiplex implementado, se realizó comparando visualmente las evidencias fotográficas (fluorescencia de amplicones obtenidos); entendiendo como óptimo, al presentar ambos fragmentos una fluorescencia y un tamaño de banda similares.

Medidas de bioseguridad. El trabajo de laboratorio se realizó 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 involucró el uso de bromuro de etidio y un transiluminador de luz UV. Debido a esto, al momento de 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.

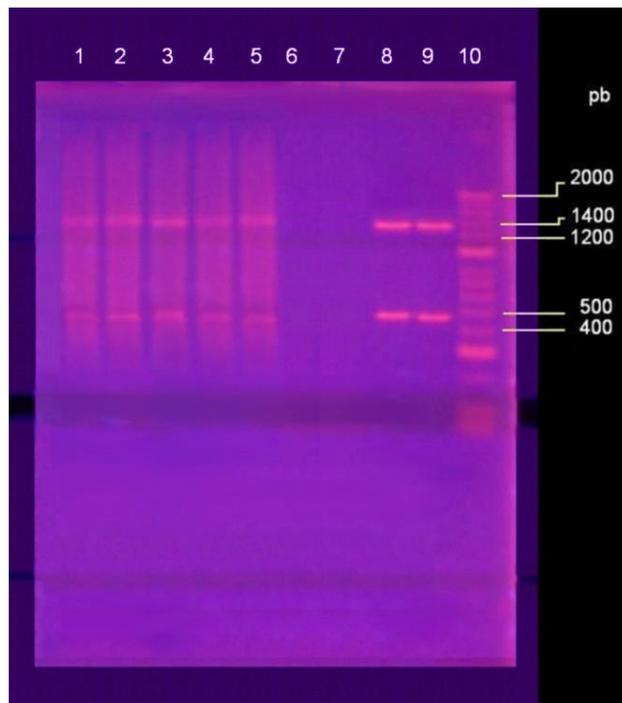
RESULTADOS

Al analizar los amplicones generados por el termociclador de gradiente de temperaturas en la electroforesis en gel de agarosa al 2% y su posterior visualización bajo luz UV, se evidenció la presencia de dos bandas de DNA de alrededor de 450 y 1300pb en los carriles correspondientes. Sin embargo, las bandas más intensas se observaron para la

temperatura de 47°C, con lo cual se pudo definir esta temperatura como la temperatura óptima de alineamiento.

De la Figura 1, es posible destacar que conservando las condiciones iniciales (alineamiento a 47° C; 60 s; elongación a 90 s), el aumento del número de ciclos (de 35 a 40) permiten obtener bandas de ADN fluorescentes aún más nítidas.

La Figura N°1 resume los resultados obtenidos en la implementación de este protocolo de PCR multiplex.



Carril	Contenido, ciclos	° C
1	RP5, 35	45
2	RP5, 35	46
3	RP5, 35	47
4	RP5, 35	48
5	RP5, 35	49
6	Control negativo, 40	47
7	Control reactivos, 40	47
8	RP5, 40	47
9	RP5, 40	47
10	MM: 100 – 2000 pb	

MM: Marcador de tamaño molecular (HyperLadder II, Bioline®)

Figura 1: Electroforesis en gel de Agarosa al 2%. Protocolo de PCR multiplex. Virus herpes canino tipo 1. Aislado nativo RP5

DISCUSION

Para el diagnóstico de la infección por CaHV-1 se utiliza tanto el examen clínico en animales vivos, como la necropsia y los estudios histopatológicos en animales muertos. Si bien estos métodos sugieren la presencia del virus, no logran ser diagnósticos definitivos. Por lo cual, el método de elección definitivo aún es el aislamiento viral, que en contrapartida demora aproximadamente un mes. Por tal motivo, un protocolo de PCR resulta evidentemente más

ventajoso ya que posee mayor especificidad, pues detecta un fragmento específico de DNA de un patógeno; mayor sensibilidad, pues en cada ciclo se genera un aumento exponencial del producto a detectar y finalmente, se debe hacer notar la rapidez con que se obtienen los resultados (9; 20; 8; 5; 16).

En consideración a lo anterior, en FAVET se han implementado varios métodos para el diagnóstico del CaHV-1 que involucran la técnica del PCR convencional: mediante la detección del gen UL37 (10), del gen gB (4), del gen gC (21) y paralelamente se encuentra en desarrollo otro estudio que detectó el gen de la timidina quinasa (TK) mediante la utilización de un PCR anidado (12, datos aun no publicados). Estos métodos, junto al presentado en esta Memoria de Título, el cual contempló un protocolo de PCR múltiple que involucró la detección simultánea de dos fragmentos de ADN de tamaños aproximados de 450 y 1280 pb, pretenden contribuir en la búsqueda de un método definitivo de diagnóstico molecular del CaHV-1 que puede ser de utilidad en la Medicina de Pequeños Animales.

En base a los resultados obtenidos, se estableció que para este PCR multiplex, una temperatura de alineamiento de 47° C, un tiempo de alineamiento y elongación de 60 y 90 s, respectivamente, y la repetición del proceso 40 veces (ciclos), permitió la obtención de los amplicones con mayor especificidad y cantidad.

El disponer de una técnica de detección temprana del CaHV-1 mediante PCR, permitiría diagnosticar y solucionar una enfermedad infecciosa que actualmente involucra problemas afectivos y pérdidas económicas. Del mismo modo se podría disminuir la alta mortalidad observada en los cachorros menores de cuatro semanas, y detectar ejemplares adultos infectados para evitar la cruce de estos animales y retirarlos del criadero. Por otra parte, conocer el status sanitario de un criadero de perros de alto valor genético, evitaría cuantiosas pérdidas a futuro, por concepto de muertes neonatales y/o abortos.

CONCLUSION

A la luz de los resultados se puede concluir que el protocolo de PCR múltiple implementado resultó exitoso y que entre las versiones moleculares de diagnóstico de CaHV-1 existentes en FAVET, podría ser el método de elección, considerando su mayor especificidad, al detectar simultáneamente dos fragmentos del gen de la glicoproteína B.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ANVIK, J.** 1991 Clinical considerations of canine herpesviruses infection. *Vet Med* 86: 394-403
2. **BOEHMER, P.; LEHMAN, I.** 1997. *Herpes simplex* virus DNA replication. *Ann Rev Biochem* 66: 347-384.
3. **CARMICHAEL, L.E.; STRANDBERG, I.D.; BARNES, F.D.** 1965. Identification of a cytopathogenic agent infectious for puppies as a canine herpes virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 120: 644-650.
4. **CARRASCO, L.** 2010. Detección del gen de la glicoproteína B del virus herpes canino a través de la reacción de la polimerasa en cadena. Memoria de título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. Pp: 1-44
5. **CARTER, G.R.; WISE, D.J.; FLORES, E.F.** 2006. *Herpesviridae*. In: A Concise Review of Veterinary Virology, G.R. Carter, D.J. Wise and E.F. Flores (Eds.) Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA.
6. **CHAMBERLAIN, J.; GIBBS, R.; CASKEY, C.** 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16:11141-56.
7. **DECARO, N.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C.** 2008. Canine adenoviruses and herpesvirus. *Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Pract.* 38: 799-814.
8. **DUMON, C.; MIMOUNI, P.** 2005. Mortinatalidad asociada a enfermedades infecciosas en la cría canina: brucelosis, herpesvirosis, micoplasmosis. In: Enciclopedia Veterinaria, Lafont A.; Durieux F. Ed. Elsevier. E-RE 2250 (1-7 pp).
9. **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.
10. **FUENTES, A.** 2010. Determinación del gen UL37 del virus herpes canino mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. Pp: 1-39
11. **INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES.** 2009. Virus Taxonomy 2009 [en línea]. <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>> [consulta: 19-12-2012]
12. **JARA, P.** 2013. Detección del gen de la timidina quinasa del Virus herpes canino tipo 1 mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada. Memoria para optar al título de Médico Veterinario. En redacción.
13. **LARENAS, J.; SANTIBÁÑEZ, M.C.; BERRÍOS, P.** 1992. Primeros antecedentes en Chile de infección por herpes canino con mortalidad neonatal. *Mevepa* 1: 13-16.
14. **MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J.** 2003. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª ed. Pearson. Madrid, España. 1011 p.

15. **METTENLEITER, T.C.; SPEAR, P.G.** 1994. Glycoprotein gB (gII) of pseudorabies virus can functionally substitute for glycoprotein gB in herpes simplex virus type 1. *J. Virol* 68: 500-504.
16. **MULLIS, K.; FALOONA, F.** 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
17. **MURPHY, F.A.; GIBBS, E. PJ.; HORZINEK, M.C; STUDDERT, M.J.** 1999. Veterinary virology. 3th ed. Academic Press. London, Inglaterra. 629 p.
18. **NAVARRO, C.; CELEDÓN, M.; PIZARRO, J.; GAGGERO, A.** 2005. Virus herpes canino en Chile: Propiedades biológicas. *Arch med vet* 37: 133-137.
19. **THE NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.** 2003. Canine herpesvirus glycoprotein B (gB) gene, complete cds [en línea]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=nucleotide&dopt=GenBank&list_uids=13958998> [consulta: 01-01-2010]
20. **RONSE, V.; VERSTEGEN, J.; THIRY, E.; ONCLIN, K.; AEBERLE´C, S.; BRUNET, S.; POULET, H.** 2005. Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. *Theriogenology*64: 61–74.
21. **VARGAS, M.** 2013. Detección del gen de la glicoproteína C del virus herpes canino tipo 1 mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. Pp: 1-30

Anexo 1.

Canine herpesvirus glycoprotein B (gB) gene. GenBank: AF361073.1

```
1 ATGTTTTTCAT TGTATCTATA TATTTTTTTTT ATTATTTTATA CTTTAATAAT ATGTGATCCA
61 ACAACACCCGG AAAGTACTAT TAATCCATTA AATCATCACA ATTTATCAAC ACCTAAACCT
121 ACTTCGGATG ATATTTCGTGA AATTTTACGT GAATCCCAA TTGAATCTGA TGATACATCA
181 ACATTTTACA TGTGCCACC ACCATCGGGA TCAACATTGG TCGGTTTGGG GCCACCTAGA
241 GCATGTCCTA ACTATAAACT TGGTAAAAAT TTTACAGAAG GAATTGCTGT AATATTTAAG
301 GAAAATATTT CTCCTTATAA ATTTAAAGCT AATATATACT ACAAAAATAT TATTATCACC
361 ACTGTATGGT CTGGAAGCAC ATATGCAGTA ATTACTAATA GATATACAGA TCGTGTACCT
421 ATAGGTGTTT CTGAAATTAC AGAGTTGATT GATAGAAGAG GTATGTGTTT ATCAAAAGCT
481 GATTATATTC GTAATAATTA TGAATTTACC GCATTTGATA AGGATGAAGA CCCAGAGAA
541 GTTCATTTAA AGCCTTCAA GTTTAATACA CCAGGATCCC GTGGATGGCA TACAGTTAAT
601 GATACTTACA CAAAATTGG GGGTTCGGA TTTTATCATT CTGGAACATC TGTAATTGT
661 ATAGTTGAAG AAGTTGATGC CAGATCTGTT TATCCATATG ATTCATTTGC TATCTCCACC
721 GGGGATATAA TTCATATGTC CCCTTTTTTT GGATTACGAG ATGGTGCTCA TACTGAATAT
781 ATTAGTTATT CAACTGATAG ATTTCAACAA ATAGAAGGT ATTATCCTAT CGACTTAGAT
841 ACTAGACTAC AGCTTGGTGC ACCAGTTTCT AGGAATTTTT TAACAACACA ACACGTTACT
901 GTTGCTTGGG ATTGGGTTCC AAAAATTCGT GAAGTGTGTA CTTTGGCTAA ATGGCGTGAA
961 ATTGATGAAA TTATTTCGTGA TGAGTATAAG GGATCTTACA GATTTACAGC AAAATCAATA
1021 TCTGCAACAT TTATTCTGTA TACTACTCAA TTTGATATTG ATCGTGTAAT GTTAAGTGAT
1081 TGTGCCAAC GTGAAGCTAT AGAAGCTATT GATAAGATCT ACAAAAAAAA ATATAATAAA
1141 ACTCATATTC AAACAGGAGA ATTGGAAACA TACTTGGCTA GAGGGGGATT TATTATAGCA
1201 TTTAGACCAA TGATTAGTAA TGAGTTAGCA AAATTGTATA TAAATGAGTT AGTAAGATCT
1261 AATCGTACGG TTGATTTGAA ATCTCTTTTA AATCCATCTG TAAGAGGGGG GGCTAGAAAAG
1321 AGAAGATCAG TAGAGGAAAA TAAAAGATCA AAACGTAATA TTGAAGGTGG TATTGAAAAAT
1381 GTAAATAATT CAACAATAAT TAAGACAAC TCATCTGTTC ATTTTGCTAT GCTTCAGTTT
1441 GCCTATGATC ATATTCAAT ACATGTTAAT GAAATGCTTA GTAGAATTGC AACTGCATTG
1501 TTGAATCTTC AAAATAAAGA GAGAACCCTT TGGAAATGAAG TTATGAACT TAATCCAACT
1561 AGTGTGGCTT CGGTTGCTAT GGATCAAAGA GTTTCAGCAC GAATGTTAGG GGATGTTCTT
1621 GCAGTTACTC AATGTGTTAA TATATCAGGT TCTAGTGTTC TTATTCAAAA TTCCATGCGT
1681 GTTTTAGGGT CAACAACACT ATGTTACAGT CGTCCTCTTA TATCATTTAA AGCACTAGAA
1741 AACTCAACTA ACTATATTGA AGGACAACCT GGGGAAAATA ATGAACTATT AGTAGAACGA
1801 AAGCTAATTG AACCATGTAC AGCTAACCAT AAAAGATATT TTAATTTGG TGTAGATTAT
1861 GTATATTTTG AAAACTATGC ATATGTTTGA AAGGTACCTC TTAATGAAAT TGAATGATC
1921 AGTGCATATG TAGATCTTAA TATTACATTA CTTGAGGATC GTGAATTTTT ACCACTAGAG
1981 GTATATACTC GAGCAGAGTT AGAAGATACA GGAATTTGG ACTATAGTGA GATTCAACGT
2041 AGAAATCAAC TACATGCACT TAAGTTTTAT GATATTGACA GTGTTGTAAA AGTTGATAAT
2101 AATGTTGTAA TTATGAGGGG CATTGCAAAAT TTCTTCCAAG GACTTGGAGA TGTGGAGCG
2161 GGATTTGGAA AAGTTGTTTT GGGTGTGCA AATGCTGTTA TTGCAACTGT TTCTGGAGTG
2221 TCCTCGTTTC TTAATAACCC ATTTGGGGCG CTAGCCGTTG GATTGCTGAT TTTAGCTGGA
2281 CTATTTGCAG CGTTTTTGGC TTATAGATAT GTTTCTAAAC TTAAGTCAA TCCAATGAAA
2341 GCACTATACC CAGTAACTAC AAGAAATTTA AAAGAAAGTG TTAAGAATGG TAATCTGGA
2401 AATAATAGTG ATGGAGAAGA AAATGATGAT AATATCGATG AAGAAAAGCT TCAACAAGCT
2461 AAAGAAATGA TTAATATAT GTCTCTAGTT TCTGCTATGG AACAGCAGGA ACATAAAGCT
2521 ATTAATAAAA ATAGTGGCCC TGCCCTTCTA GCAAGTCACA TTACAAACCT ATCTCTTAAA
2581 CATCGTGGTC CAAAATACAA ACGTTTGAAG AATGTAAATG AAAATGAAAG TAAAGTTTAA
2641 TAAAAAATTT AAATATTACG TAAA
```