



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



**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA VIRUS
HERPES FELINO MEDIANTE LA DETECCIÓN DEL GEN *ul37* POR
MEDIO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.**

**IMPLEMENTATION OF A DIAGNOSTIC METHOD FOR FELINE
HERPES VIRUS BY MEANS OF THE DETECTION OF THE GENE *ul37*
USING THE POLYMERASE CHAIN REACTION**

CLAUDIA CAROLINA ZENTENO CORNEJO

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

PROFESOR GUÍA
CARLOS NAVARRO VENEGAS

AUCAI
2011

SANTIAGO, CHILE
2012



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



**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA VIRUS
 HERPES FELINO MEDIANTE LA DETECCIÓN DEL GEN *ul37* POR
 MEDIO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.**

CLAUDIA CAROLINA ZENTENO CORNEJO

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 : MARIA ANTONIETA JARA
PROFESOR CONSEJERO : LORETO MUÑOZ ARENAS

SANTIAGO, CHILE

2012

RESUMEN

Los felinos domésticos son susceptibles a afecciones de variada etiología y la principal enfermedad respiratoria que los afecta es el denominado Complejo Respiratorio Felino (CRF), de etiología multifactorial y de distribución mundial, produce lesiones que sólo se tratan de forma sintomática y que, además, pueden dejar secuelas inhabilitantes para el animal.

Entre los agentes virales asociados al CRF se encuentra el Virus Herpes Felino (VHF-1), un patógeno común en la clínica de animales de compañía y que al no existir un tratamiento definitivo y certero para esta enfermedad, hace necesario contar con un diagnóstico eficaz que permita detectarlo precozmente y así evitar su propagación.

En consideración a lo anterior, esta Memoria de Título corresponde a un tercer estudio en paralelo a fin de establecer un protocolo para el diagnóstico molecular de VHF-1, mediante la detección del gen de la proteína UL37 utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional. Con el antecedente de que el gen del virus herpes canino tiene una similitud de un 90% con el gen del virus herpes felino, esta técnica podría detectar ambos virus.

Sin embargo, pese a tener alta similitud genómica los resultados de la prueba mediante esta técnica fueron negativos, estableciéndose la alta especificidad que tiene el virus con cada especie hospedadora.

Palabras clave: Complejo Respiratorio Felino, Herpes Felino, *ul37*, Diagnóstico Herpes Felino.

ABSTRACT

Domestic felines are susceptible to affections of varied etiology. One of the main respiratory diseases that affects them is the one called Feline Respiratory Complex (FRC), of multifactorial etiology and of world distribution, which produces lesions that are only treated according to the symptoms which can later leave harmful sequels for the animal.

The viral agents associated to FRC are feline herpes virus (VHF-1) a commonly pathogen found in small animal clinic, which does not have a definitive and effective treatment, so it becomes necessary to find an effective diagnosis method that allows early detection in order to avoid its spread.

Due to these reasons, this study is a third attempt in parallel o establish a protocol for the molecular diagnosis of VHF-1, through the detection of the UL37 protein gene using conventional Polimerase Chain Reaction (PCR). With the background of a previous study that detects the UL37 protein gene in canine herpes virus, which proved to be similar to feline herpes virus in 90%, this diagnostic method could simultaneously detect both virus.

Nevertheless, in spite of having so much similarity the results of this test by means of this technology were negative, there by establishing the high specificity that the virus has within every host species.

Keywords: Feline Respiratory Complex, Feline Herpesvirus, *ul37*, Feline Herpesvirus Diagnosis.

INTRODUCCIÓN

El virus Herpes Felino (VHF-1) causa la Rinotraqueitis viral felina. Fue aislado por primera vez por Crandell y Maurer en 1957 (25), tiene distribución mundial y se conoce sólo un serotipo (tipo 1) (26) y, aunque es antigénicamente similar a otros virus herpes, no es zoonótico ni causa enfermedad en otras familias de animales (5).

EL VHF-1 es miembro del orden *Herpesvirales*, familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae* y género *Varicellovirus* (18); los cuales tienen una amplia gama de hospedadores y son altamente especie-específicos, se replican rápidamente en muchos tipos de células y aunque son sumamente líticos, pueden establecer latencia en neuronas y células gliales (20).

Así como VHF-1 infecta a gatos domésticos también lo hace con otros miembros de la familia *Felidae*. Este virus está estrechamente relacionado genética y antigénicamente con Virus Herpes Canino (VHC-1) y Virus Herpes Fócido 1 y 2 (26).

Los viriones de la familia poseen un tamaño que oscila entre 120-200 nm y son morfológicamente indistinguibles entre ellos. Su genoma está encapsulado en una cápside icosaédrica compuesta por 162 capsómeros, cubierta por una envoltura lipídica extraída de la célula infectada. En la envoltura lipídica se encuentran las glicoproteínas. Poseen un tegumento, que es una estructura amorfa de naturaleza proteica asimétrica localizada entre la cápside y la envoltura lipídica (20).

El genoma de virus herpes es un ADN de doble hebra lineal y la variación en el tamaño del genoma entre miembros de la familia *Herpesviridae* es debido a un arreglo característico de sus secuencias de ADN (20).

El genoma de los virus herpes tiene secuencias internas repetidas: una región única larga (UL) y una región única corta (US); estas repeticiones permiten cambios genómicos entre los distintos virus herpes. El genoma de estos virus es grande y codifica para al menos 100 proteínas diferentes, muchas de las cuales son estructurales y formarán el denominado tegumento (20).

El tegumento tiene un papel clave durante el ensamblaje viral de los virus herpes; donde se han identificado un total de 23 proteínas. Las proteínas UL36, UL37 y UL48 son esenciales para dicho ensamblaje. La proteína UL37 es conservada en todos los miembros de la familia *Herpesviridae* y es requerida para la formación normal de la cápside viral en virus envueltos (20).

Durante el ensamblaje viral, la localización y adición de la proteína UL37 a la nucleocápside depende de la unión con otra proteína del tegumento, la UL36. La interacción de UL36 con UL37 es conservada en toda la familia *Herpesviridae* (13).

El VHF-1 replica en el epitelio superior respiratorio y ocular así como en neuronas. La excreción viral por secreciones nasales, orales y oculares comienza rápidamente después la infección. Aunque el virus puede persistir en el entorno durante unos días, es fácilmente destruido por la mayor parte de los desinfectantes. Luego de la infección, continúa una proliferación lítica en el epitelio respiratorio y ocular. El virus avanza por los nervios sensoriales hasta alcanzar las neuronas y en el ganglio trigémino se concentra (5).

El VHF-1 causa una enfermedad respiratoria superior aguda y ocular la cual puede ser particularmente severa en gatos pequeños. Es común la ulceración de la mucosa, la rinitis y la conjuntivitis y ocasionalmente pueden apreciarse úlceras dendríticas en la córnea que son consideradas patognomónicas de la enfermedad. Se pueden presentar signos como fiebre, depresión, anorexia, descarga serosanguinolenta ocular o nasal, hiperemia conjuntival, estornudos, salivación y tos. La infección bacteriana secundaria es común y con esto las secreciones se hacen purulentas. En gatitos susceptibles puede producir signos severos de forma generalizada que les puede causar la muerte (26). En la forma crónica se produce una rinosinusitis que se perpetúa por mecanismos inmunomediados y que conducen a la destrucción de las turbinas nasales y el hueso (26).

Las principales fuentes de infección son gatos que presentan la forma aguda de la enfermedad, gatos con enfermedad crónica que reactivan la infección viral y que diseminan el virus en secreciones tanto conjuntivales como nasales y la contaminación del medio, aunque ésta no es una forma primaria de transmisión, es importante en grupos de gatos (26).

Aunque los gatos generalmente se reponen del cuadro agudo dentro de dos a tres semanas, permanecen infectados de forma vitalicia y pueden experimentar la reactivación viral intermitente durante momentos de estrés o durante inmunosupresión (5).

El VHF-1 es parte del complejo respiratorio felino (CRF) en el cual se han identificado patógenos virales y bacterianos. La infección simultánea con varios de éstos exacerba la severidad de la enfermedad. Los patógenos virales más comunes son calicivirus felino y virus herpes felino; las bacterias *Chlamydomphila felis* y *Bordetella bronchiseptica* considerados también como patógenos primarios; *Mycoplasma* que es comensal normal y, aunque sumamente raros, ciertos virus de gripe H5N1 pueden causar signos respiratorios en gatos y son de preocupación debido al potencial teórico de zoonosis (5).

Diagnóstico: la microscopia electrónica es el método más idóneo de detección/identificación de virus, donde a través de la visualización directa de la morfología se puede caracterizar, identificar y asignar un virus a una familia específica (16). Sin embargo el método más utilizado para la detección de virus en muestras biológicas es la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La detección de ácidos nucleicos por medio de la PCR convencional, anidada o en tiempo real son de rutina en los laboratorios para la detección de virus herpes; es así como son utilizadas muestras de conjuntiva ocular, raspado de córnea y orofaringe, humor acuoso, etc. (26) demostrando la diversidad de muestras que se pueden utilizar para la realización de esta técnica.

Ya que las cantidades de ácidos nucleicos detectados por la PCR son mínimas, los resultados positivos pueden no estar asociados con la enfermedad y por lo tanto, tienen que ser interpretados con precaución. El valor diagnóstico también depende de las muestras analizadas ya que el raspado de córnea y biopsias son mayormente positivas en comparación con el raspado conjuntival (26). La técnica de la PCR además detecta virus en animales recientemente vacunados y con latencia viral aunque no presenten los signos clínicos (26).

La idea básica de la técnica es sintetizar repetidamente un fragmento de ADN utilizando una polimerasa termoestable: *Taq* polimerasa. Al realizar una PCR se simula lo que sucede en una célula al sintetizar su ADN y en el tubo de ensayo se mezclan todos los reactivos necesarios: la enzima, el ADN (donde se encuentra el fragmento que se quiere sintetizar), los desoxinucleótidos y los partidores necesarios para iniciar la reacción. El tubo con la mezcla se lleva a un termociclador, que lo calienta y enfría a tres temperaturas distintas en ciclos programados, la primera es a 95° C (denaturación del ADN), luego a un intervalo entre 40° y 60° C (alineamiento de partidores) y finalmente a 72° C (extensión o síntesis de la cadena de ADN). Este proceso se repite entre 20 a 40 veces y genera millones de copias del fragmento deseado (19).

Debido al masivo empleo y disponibilidad de ensayos de la PCR en pruebas virológicas se debería tomar en cuenta las ventajas potenciales y las limitaciones de estos ensayos. La PCR es sobre todo útil en la detección de virus que son difíciles de obtener a través de aislamiento viral en cultivos celulares; además puede utilizarse sobre cualquier muestra que presente el virus; la decisión de hacer la PCR en lugar de realizar otras pruebas para detectar el virus está basada en la velocidad, el costo y la capacidad del laboratorio. La PCR puede ser usada para reducir el riesgo de exposición para el personal de laboratorio en caso de virus infecciosos (16).

Una limitación de la PCR o de cualquier técnica de amplificación de ácidos nucleicos puede ser la muestra objetivo donde se encuentren los virus. El material de la muestra puede inhibir las

enzimas del ensayo como es el caso de muestra fecales o de leche. Deben incluirse muestras controles en este tipo de casos para descubrir si hay problemas en el proceso de amplificación.

Asimismo, deben usarse partidores específicos que se acoplen a la secuencia del virus de la muestra, en caso contrario no se generará amplificación de ADN y por lo tanto no podrá visualizarse (16).

Otros métodos diagnósticos como el aislamiento viral, todavía es válido para detectar VHF-1 pero requiere más tiempo (26). Se realiza en cultivos celulares donde se produce la cantidad necesaria de viriones para identificar o caracterizar un virus (16). Es menos sensible que la PCR, pero revela el virus viable y no solamente su ADN. En infecciones primarias de VHF-1, el virus es fácilmente aislado de tejido conjuntival, nasal y de faringe. Cuando la enfermedad pasa a ser crónica el aislamiento de virus es más difícil. Por estos motivos logísticos, el aislamiento de virus no es usado rutinariamente para el diagnóstico de infección VHF-1, a pesar de su sensibilidad en los casos de enfermedad aguda (26).

Pueden utilizarse también técnicas inmunológicas tanto para la detección de antígenos como de anticuerpos virales (16). La sensibilidad analítica varía a través de las distintas pruebas entre las que se encuentra, por ejemplo, la inmunofluorescencia (IF) que puede ser usada en muestras de conjuntiva, córnea o biopsias pero la aplicación de fluoresceína debería ser evitada antes del muestreo ya que esto puede dar resultados falsos positivos. En infecciones crónicas IF es el ensayo menos sensible incluso que el aislamiento de virus o la PCR (16).

Los anticuerpos a VHF-1 pueden ser detectados en el suero, el humor acuoso y el fluido cerebroespinal por la técnica de inmunoabsorción enzimática (ELISA). Debido a la infección natural y la vacunación, la seroprevalencia es alta en gatos, y la presencia de anticuerpos no correlaciona con la enfermedad y la infección activa. Además, la serología no distingue entre animales infectados y vacunados. Los anticuerpos aparecen 20-30 días después de la infección primaria, y los títulos pueden ser bajos, tanto en los casos de enfermedad aguda como crónica. La serología, por lo tanto, es de valor sólo limitado en el diagnóstico de infección (26).

Antecedentes diagnósticos. Fuentes (2010) implementó un protocolo para la detección molecular del gen de la proteína UL37 de VHC-1 mediante la PCR convencional (9). Teniendo en cuenta que el VHF-1 tiene una similitud genética de un 90% con VHC-1 (Anexo 1); en este estudio se procedió a establecer un método diagnóstico para ambos virus herpes mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando los mismos partidores y protocolo utilizados por Fuentes, basado en porcentaje de identidad nucleotídica (PIN) planteado anteriormente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Esta Memoria de Título fue realizada en los laboratorios de Microbiología y Virología del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Muestras. Se utilizaron 13 muestras de hisopado conjuntival provenientes de 11 gatos domésticos pelo corto menores de un año de edad, que fueron tomadas y utilizadas en un estudio anterior realizado por Macías (15) donde los gatos se seleccionaron por estar cursando el cuadro agudo de la infección por Virus Herpes Felino, presentando los signos clínicos de: fiebre, conjuntivitis uni o bilateral, secreción muco-purulenta nasal y ocular y úlcera corneal, típicos de infección. Las muestras utilizadas en este ensayo fueron homogenizadas en un plazo de 24 horas mediante la utilización de un “vortex” en un tubo con 100 µL de solución buffer salina fosfatada y conservadas a 4° C hasta la prueba de PCR. Además se confirmó por la técnica de la PCR anidada que las muestras eran positivas a VHF-1.

Detección del gen de la Proteína UL37 mediante la PCR. Para la realización de la técnica de la PCR se utilizó un termociclador Apollo (CLP, USA) de 96 pocillos de 0,2 mL.

Partidores: Para la detección del gen de la proteína UL37 se utilizaron los partidores descritos por Erles *et al.* (2004) que amplifican segmentos de 494 pb en el VHC-1 (8). Estos partidores corresponden al gen *ul37* del VHC-1.

5'- AAGAGCTCGTGTTAGTGAAAAT -3'

5'- TAAACCCGCTGGATGATAC-3'

Mezcla de la reacción. Se utilizó un kit 2X PCR Master Mix (Fermentas®), que contiene la *Taq* polimerasa, los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), el buffer de reacción y MgCL₂. En un tubo Eppendorf de 0,2 mL se adicionaron 15 µL del Master Mix, 5 µL de cada uno de los partidores y 5 µL de la muestra obteniendo un volumen total de 30 µL.

Amplificación del ADN. El protocolo para la amplificación consistió en una denaturación inicial a 95° C durante 1 minuto y luego 35 ciclos que constan de una denaturación a 95° C por un minuto, alineamiento a 49° C por 40 segundos y elongación a 72° C por 1 minuto. Finalmente una elongación a 72° C por 10 minutos. El tamaño de la banda esperado fue 494 pb (6).

Como control positivo se utilizó la vacuna activa atenuada liofilizada FELIGEN CRP® (Virbac®) que contiene virus atenuado de Calicivirus Felino, Herpes Felino y Virus de la Panleucopenia; y como control negativo una muestra de torulado ocular de gato sano comprobado por la técnica de la PCR anidada.

Visualización de los productos amplificados. Se realizó 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®), para verificar el progreso de la migración de las bandas de ADN.

En el pocillo respectivo del gel se depositó una alícuota de 6 µL de esta mezcla. La electroforesis se llevó a cabo a 90 volts por 45 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 µL/mL) (Fermelo®) por 30 minutos y el ADN se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminator UVP®).

Medidas de Bioseguridad. Las medidas de bioseguridad establecidas para los laboratorios de Microbiología y Virología Animal contemplan el uso de material limpio, correcta eliminación de desechos y la utilización de delantal y guantes de látex. El proceso de visualización del producto amplificado involucró el uso de bromuro de etidio y un transiluminador de luz UV, por lo cual, al momento de visualizar el gel se utilizó una placa de acrílico y gafas con filtro UV. Posteriormente la eliminación del gel incubado en bromuro de etidio contempló su incineración, pues el compuesto químico tiene, entre otras, propiedades mutagénicas.

RESULTADOS

Al realizar la técnica de la PCR convencional con los partidores descritos y el protocolo especificado, en la electroforesis realizada no se observaron bandas visibles en ninguna de las 13 muestras ni en el control positivo (vacuna Triple felina). Por lo tanto el protocolo utilizado para la realización de esta técnica no es el adecuado para establecer el diagnóstico de VHF-1. (Figura 1).

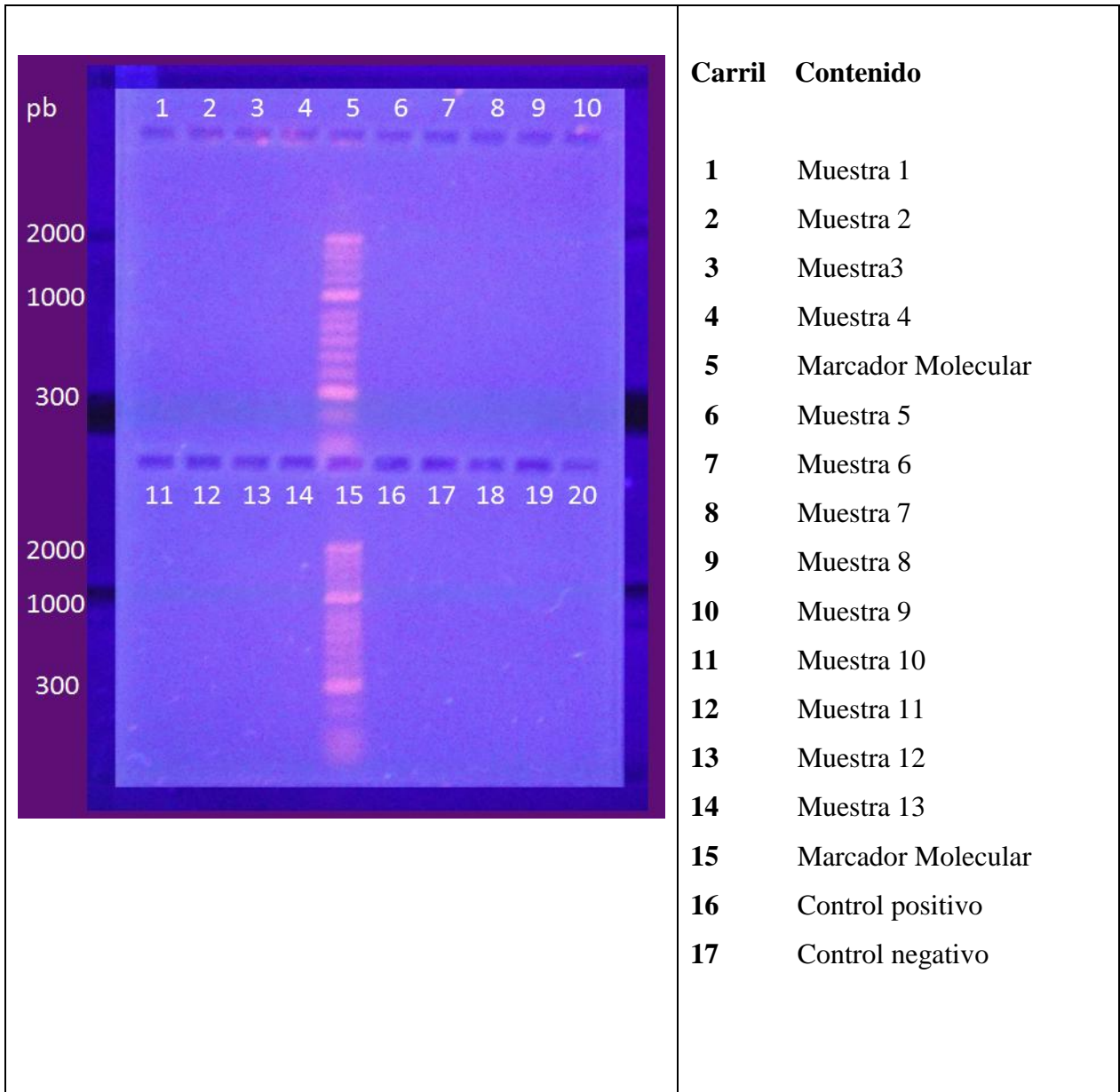


Figura 1. Detección del gen *ul37* del VHF-1 en muestras directas de conjuntiva ocular felina.

DISCUSIÓN

En los Laboratorios de Microbiología y Virología del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile desde 2010 se han realizado Memorias de Título orientadas a obtener métodos diagnósticos para el virus Herpes, uno de los virus importantes dentro de la clínica veterinaria en pequeños animales. En primera instancia se realizaron estudios para implementar un método diagnóstico de virus herpes canino, lográndose resultados favorables (3,9) y en la actualidad se están haciendo estudios para detectar virus herpes felino mediante la técnica de la PCR (15, 24).

Al comparar las secuencias almacenadas en la base de datos Genbank del gen de la proteína del tegumento UL37 tanto del VHF-1 como de VHC-1 a través del programa *on line* ClustalW®, se estableció un porcentaje de identidad nucleotídica (PIN) de 90% entre ellas. Porcentaje alto considerando que el virus herpes es altamente especie específico.

Con este antecedente en cuenta, en esta Memoria de Título se utilizó el mismo protocolo y partidores para el gen de la proteína UL37 de VHC-1 descrito por Erles *et al.* (8), para así disponer de un método de detección simultaneo, tanto para VHC-1 como para VHF-1.

El objetivo de establecer un mismo protocolo se centra en que la detección de la proteína UL37 para VHC-1 fue exitosa utilizando la técnica de la PCR convencional, al contrario de la mayoría de los estudios que se realizan para la detección de virus herpes donde se utiliza la técnica de la PCR anidada (11, 22, 23). Respaldo por el alto valor de PIN entre el gen estudiado para VHC-1 y VHF-1 y asumiendo que la diferencia en las bases del gen no estuviese en la zona de los partidores, sino que se encontrara dispersa a lo largo de la secuencia del gen de la proteína UL37, es que se consideró el mismo protocolo. Sin embargo, al realizar la técnica de la PCR convencional, no hubo visualización de bandas de ADN en ninguna de las 14 muestras, incluido el control positivo (vacuna Triple Felina). Esto sugiere que, a pesar del alto valor de PIN (90%), existirían otros factores que podrían influir en la nula detección, como sería la presencia de inhibidores de la PCR en la muestra.

El efecto de los inhibidores es conocido, pero los mecanismos empleados son confusos. No todas las reacciones de la PCR son igualmente afectadas por los mismos mecanismos inhibitorios; asimismo, no todas las etapas de la técnica son afectadas de la misma forma, es el caso de la etapa de alineamiento que, con temperaturas más altas son menos afectadas por la inhibición (1). Aunque los inhibidores pueden afectar distintos componentes de la reacción, la información originada en literatura científica ha sido enfocada hacia la inhibición de las polimerasas

utilizadas. Una amplia gama de sustancias puede inhibir fuertemente la actividad de esta enzima y limitar el empleo de la técnica de la PCR y en su mayoría son parte de la muestra. Así, las polimerasas pueden ser degradadas por proteinasas, desnaturalizadas por el fenol o detergentes, e inhibidas por la obstrucción de su sitio activo (1,2).

Se descartaría completamente que el resultado negativo esté sujeto a una falla en la toma de las muestras ya que éstas y el control positivo fueron utilizadas en dos estudios paralelos con resultados positivos. Efectivamente, en la Memoria de Título realizada por Sepúlveda (24) se logró detectar 1/14 muestras positivas utilizando el gen de la glicoproteína B del VHF-1 como modelo de detección (Anexo 2). Adicionalmente, en el otro estudio paralelo realizado por Macías (15) se describe por primera vez en Chile el diagnóstico molecular del virus herpes felino por medio de la detección del gen de la proteína Timidin Kinasa mediante la técnica de la PCR anidada, con resultados positivos y con 100% de detección, utilizando las mismas muestras de este estudio. Cabe destacar que la presencia de inhibidores en la muestra podría explicar también la baja tasa de detección obtenida por Sepúlveda (7%), y la nula visualización de productos en 10 de las 14 muestras observado por Macías durante la primera PCR de la variante anidada. Adicionalmente, la vacuna comercial utilizada como control positivo no generó una banda visible. Este resultado podría corroborar la existencia de inhibidores, ya que la técnica de la PCR detecta cantidades bajas de material genético, y en su publicación *on line* la vacuna tiene 10^5 - 10^7 DICT₅₀ de virus.

Un estudio realizado por Maggs y Clarke (2005) comparó seis protocolos de la PCR convencional y anidada para el gen de la Timidin Kinasa utilizando como muestras vacunas comerciales; en este ensayo se estableció que la sensibilidad del protocolo está directamente relacionada con el número de ciclos realizados; es decir, a mayor número de ciclos, mayor sensibilidad. El protocolo que resultó con mayor sensibilidad fue el que realizó 70 ciclos y el que resultó con menor sensibilidad fue el realizado con 35 (18). Esto podría explicar la nula detección de la vacuna en esta Memoria, ya que en este ensayo se realizaron 35 ciclos en la PCR.

Con respecto a la conservación, a causa de la labilidad de muchos virus, las muestras deben ser guardadas frías y húmedas. En muestras colectadas con tómulas o esponjas se debe tener un medio de resguardo como la solución salina, a ésta se le añade gelatina, albúmina o suero fetal bovino, además de antimicrobianos, con el fin de proteger al virus de la inactivación y la multiplicación de bacterias (16); las muestras utilizadas en este ensayo fueron homogenizadas y conservadas a 4°C hasta la prueba de la PCR.

Motivo de discusión puede ser la elección del gen de la proteína en estudio. La proteína UL37 ha sido considerada por varios autores ya que es altamente conservada en todos los virus herpes y además es esencial para el ensamblaje viral (6, 7, 12, 20); esto hace que su detección por medio de la técnica de la PCR no tan sólo en virus herpes, sino también en otros virus sea óptima. Un estudio realizado para la detección de citomegalovirus en humanos, comparó tres pares de partidores para genes de distintas proteínas altamente conservadas donde se incluía la proteína UL37, demostrando que la detección de ésta fue la más sensible entre las probadas (14).

Así, se deja en evidencia que la detección de la proteína es factible y que el resultado negativo en esta memoria es un problema en el protocolo utilizado.

Considerando los resultados de ésta y de las otras Memorias de Título, una alternativa para mejorar la detección del gen de la proteína UL37 en el VHF-1 sería implementar una PCR anidada mediante el diseño *in silico* de un par de partidores mediante un programa *on line* gratuito de la empresa comercial Invitrogen® (10).

Al incorporar la secuencia nucleotídica del gen *ul37* para VHF-1 (Anexo 3) en el programa *on line* se obtienen el primer par de partidores que arroja este programa y un tamaño del fragmento de ADN de 318 pb. Utilizando este mismo fragmento de ADN como molde se obtiene el segundo par de partidores y un fragmento de 120 pb. Ambos fragmentos son factibles de enviar a secuenciar para verificar la validez del protocolo (Anexos 4 y 5) y sin duda se podrá contar con una herramienta rápida y de alta sensibilidad para una de las enfermedades más importantes en los felinos domésticos.

CONCLUSIONES

No fue posible establecer un protocolo simultáneo para detectar VHF-1 y VHC-1 mediante de la detección del gen de la proteína UL37, utilizando partidores específicos de virus herpes canino.

Se propone establecer el mismo estudio con partidores específicos para virus herpes felino y en el caso de no disponer de su secuencia, diseñarlos por medio de un programa *on line* de acceso gratuito.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ALAEDDINI, R.** 2012. Forensic implications of PCR inhibition- A review. *Forensic Science International: Genetics* 6: 297-305.
2. **BAAR, C.; D`ABBADIE, M.; VAISMAN, A.; ARANA, M.; HOFREITER, M.; WOODGATE, R.; KUNKEL, T.; HOLLIGER, P.** 2011. Molecular breeding of polymerases for resistance to environmental inhibitors. *Nucleic Acid Research*. 39 (8): 1-12.
3. **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 Título Médico Veterinario. Santiago, U. de Chile. Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 54p.
4. **CLUSTALW2.** 2012. [en línea]. <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=clustalw2>> [consulta: 10-07-2012].
5. **COHN L.** 2011. Feline Respiratory Disease Complex. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 41: 1273-1289.
6. **DAVISON, A.** 2010. Herpesvirus systematic. *Veterinary Microbiology*. 143: 52-69.
7. **DAVISON, A.; DARGAN, D.; STOW, N.** 2002. Fundamental and accessory systems in herpesviruses. *Antiviral Research*. 56: 1-11.
8. **ERLES, K.; DUBOVI, E.; BROOKS, H.; BROWNLIE, J.** 2004. Longitudinal Study of Viruses Associated with Canine Infectious Respiratory Disease. *J. Clin. Microbiol.* 42 (10): 4524-4529.
9. **FUENTES, A.** 2010. Determinación del gen UL37 del virus herpes canino mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 52 p.
10. **INVITROGEN.** 2012. [en línea]. <<http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>> [consulta: 13-05-2012].
11. **KANG, B-T.; PARK, H-M.** 2008. Prevalence of feline herpesvirus 1, feline calicivirus and *Chlamydomphila felis* in clinically normal cats at a Korean animal shelter. *Journal Veterinary Science*. 9 (2): 207-209.
12. **KELLY, B.; FRAEFEL, C.; CUNNINGHAM, A.; DIEFENBACH, R.** 2009. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Research*. 145: 173-186.
13. **KELLY, B.; DIEFENBACH, E.; FRAEFEL, C.; DIEFENBACH, R.** 2012. Identification of host cell proteins which interact with herpes simplex virus type 1 tegument protein pUL37. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 417: 961-965.

14. **LESPERANCE, M.; CONTOPOULOS-IOANNIDIS, D.; GUTIÉRREZ, M.; COLBERG-POLEY, A.** 1998. PCR Detection of human Cytomegalovirus DNA in clinical specimens using novel UL37 exon 3 and US3 primers. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 5 (2): 256-258.
15. **MACÍAS, P.** 2011. 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. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 24 p.
16. **MCLACHLAN, N.; DUBOVI, E.** Laboratory Diagnosis of Viral Infections. **En:** MCLACHLAN, N.; DUBOVI, E. *Fenner's Veterinary Virology*. 4ª edición. Estados Unidos, Academic Press, 2011. pp. 101-123.
17. **MCLACHLAN, N.; DUBOVI, E.** Herpesvirales. **En:** MCLACHLAN, N.; DUBOVI, E. *Fenner's Veterinary Virology*. 4ª edición. Estados Unidos, Academic Press, 2011. pp. 179-201.
18. **MAGGS, D; CLARKE, H.** 2005. Relative sensitivity of polymerase chain reaction assays used for detection of feline herpesvirus type 1 DNA in clinical samples and commercial vaccines. *American Journal Veterinary Research*. 66 (9): 1550-1555.
19. **MULLIS, K.; FALOONA, F.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 155: 335-350.
20. **NEWCOMB, W.; JONES, L.; DEE, A.; CHAUDHRY, F.; BROWN, J.** 2012. Role of a reducing environment in disassembly of the herpesvirus tegument. *Virology*. 431: 71-79.
21. **PADGETT, D.; BAILEY, M.; SHERIDAN, J.** 2007. Herpesviruses. *Encyclopedia of Stress*. 305-311.
22. **PERSICO, P.; ROCCABIANCA, P.; CORONA, A.; VERCELLI, A.; CORNEGLIANI, L.** 2011. Detection of feline herpes virus 1 via polymerase chain reaction and immunohistochemistry in cats with ulcerative facial dermatitis, eosinophilic granuloma complex reaction patterns and mosquito bite hypersensitivity. *Veterinary Dermatology*. 22: 521-527.
23. **ROUHIZADEH, A.; SEYFI ABAD SHAPOURI, M. R.; AVIZEH, R.; MOSALLANEJAD, B.; POURMEHDI BROJENI, M.** 2010. Feline herpesvirus 1 infections in a domestic cat population in Ahvaz, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 12 (3): 242-246.
24. **SEPÚLVEDA, C.** 2012. Implementación de una técnica diagnóstica molecular para la detección del gen de la glicoproteína B del virus herpes felino. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 24 p.
25. **TAI, S.; NIKURA, M.; CHENG, H.; KRUGER, J. WISE, A.; MAES, R.** 2010. Complete genomic sequence and an infectious BAC clone of feline herpesvirus-1 (FHV-1). *Virology*. 401: 215-227.

26. **THIRY, E.; ADDIE, D.; BELAK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; HOSIE, M.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M.; RADFORD, A.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M.** 2009. Feline Herpesvirus Infection ABDC guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 11: 547-555.

ANEXOS

Anexo 1: Porcentaje de identidad nucleotídica del gen *ul37* de VHC-1, VHF-1 y VHP-1.

EBI > Tools > Multiple Sequence Alignment > ClustalW2

ClustalW2 Results

Alignments | **Result Summary** | Guide Tree | Submission Details | Submit Another Job

Result files

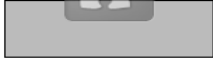
Input Sequences
[clustalw2-l20120708-230711-0935-9850041-oy.input](#)

Tool Output
[clustalw2-l20120708-230711-0935-9850041-oy.output](#)

Alignment in CLUSTAL format
[clustalw2-l20120708-230711-0935-9850041-oy.clustalw](#)

Guide Tree
[clustalw2-l20120708-230711-0935-9850041-oy.dnd](#)

JaView

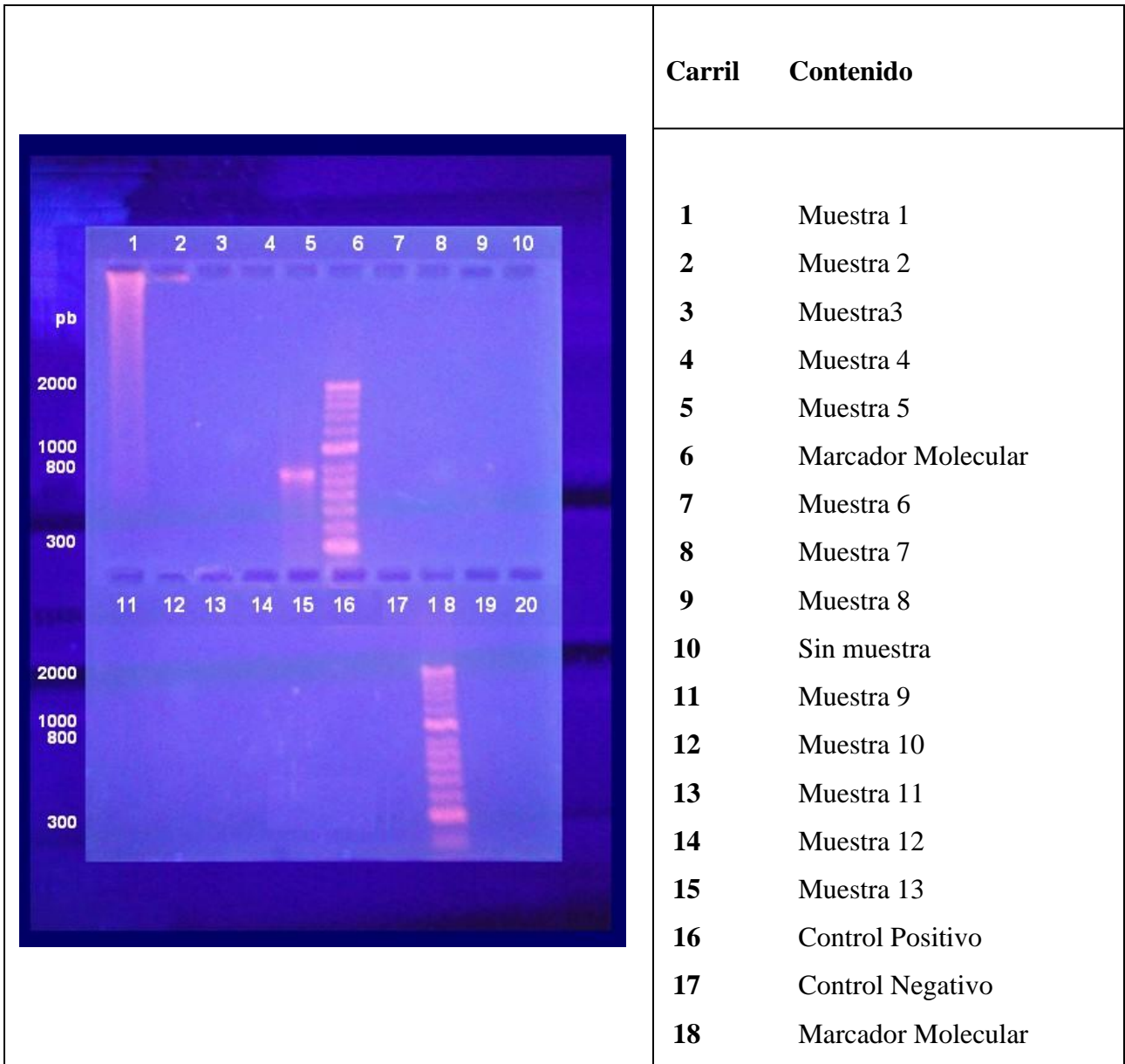


Scores Table

[View Output File](#)

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	Canid	494	2	Feline	3084	90.0
1	Canid	494	3	Suid	2830	54.0
2	Feline	3084	3	Suid	2830	44.0

Anexo 2: Detección del gen *gB* del VHF-1 en muestras directas de conjuntiva ocular felina. La muestra 5 es declarada como positiva a VHF-1.



Anexo 3: Secuencia del gen *ul37* VHF-1. GenBank: FJ478159.2

ATGGATAATAGCGGACCCCTTATGACTCTAGTAGCCTCCCTTGAAGGGCTAGTAGGCGTAGCCAGTGACA
GACTAACCCAGGATGGTGTGTTTTGCGGATAAAGTCTATGATCTCTGAATTTTTTTTATCTACGGATTCTAT
AGAACTCCCGGATACGCAAAGATTATGGGCTAAGTTACAAAACTAGCATGTGATGCCTATTTACATACA
CGGAGCCCCGAGACCCGCTTTTTGGCTGAAAATCTGCCAGGATTAATTTTCTGGAGATTTAAACATGATT
GGACGGAGAGCCCAATTAATGATCTCACTGATATATCAACCTTATTGGATGTGATGAACGACGAGGAGTG
TATGGCCTGTATAACTACGGCTGGGCTACGAGTATCTTCATTTCTGGGTCCATCTAACATCTATCGGCTT
GTTAGTGAATGGATAGTCCTATTTAAGGAGATATATCTAGGGGTGTTAAATAAAACCCCATCTGATGCAT
TAAACGAACCGCTATATCATCCCTTGATAAGTTTTCAGAACCCCTCGTTTCGAAGAAATTTGAACTTCT
ATATGGCATGCCTTTTGTCCAGGAGGGTTACGTGTGATAGCCATCAGAGCGAATTGGTTGGTACAGTTT
GGGGTTATGGTTCAAAGGACCAGAGATTCTACGCTAACCCCACTCACCCGTGCGTTATATATGTTGGCTC
TAGTGGACGAATTTTTCAAGATATCGAGCAAACATCTACATACACTACGCTCGTTAGAGATTTTTCTGGA
ACTCACCCAGGAGATTGACGAAGGAGCCCTGGTACCTTTACAGGCCGCTAATCTATCACCGCGAACTGCT
TATGAGGTTAGAATATCCTCGGCAATAGCACATCAAAATCCTTTCATAACCAATCCTCAGCCAGGAACGG
TGACTGTACGTTTACGCACGGACCCCGAGATTCTTACCGAACGACATCTAAATTTAGAGGCACTCCTTAT
CCACGTCACAGCAATTATCAGACTATTAGATTCAAAGGACATCACCTATGAAGATGGATCCAATACCATA
TGGAATTATGTGGTTGAATGCACTACAAATACATGGGAGGTTATCCAGGCGAGCACGAATCCACATCAAG
CCATAGAGGCGCTTATCAAGCAGGATTTACATCATTTTCATTGTAGTATGTTAGAACGTGCCATCTCCGA
TAAATTTTCCAAGGCACGGATAAGTAATATTAACCGACACTCTATCCAAAGACCTCTCTTGGATGAGGCG
CAACAGGCAATTGGCTGTGTTGCCATGGTGGGGAGTTTGATATTTAAATTAGTGACACATTATGGAAATG
GTCTAGATTATATTAGACATTATACTACCACTCTCGCAGATTTACCTCTAGTATACGGAGACTTGCTCGA
TTCACTCGGTTTACCGAATGGTAGTGTGGAACAGATCATACGCCATTGTATGGCACCAAAAACCATATATA
GATTACATCACAAATTCGAGGGTGGTTTTTGGAGACGGAGTTAAACTTGGTTGATCAGAGAGTGGTTACTG
TGGAGGGTAATACACACAACGCTGCGAGAGAATCACTTTTAAATGTGGTTCGATTTCAAAGCGAGAGATCT
ATGGGGTATCAAGTACAATATGATGCCTATAACAAGTGGTCAGGGTAGAGAATCGTCAGAACACAGTGT
AGTGAAGTAGATCTTCTTTTTGGCGGCTATACAGATAGAATATCCATCTATTGATGGAGTACCACATCATG
TTCTATCTGAGCCAGCTTTTACCCCTTATCTATTTATAACAGTAGTTTTGGATGCCCTACACGTA CTGAT
CACCTCTAGATTTTCGGGCAAAACACTAATAGATGTTATTAAGGTATGTACATGGGCCCCGAGATTATGGT
ATAGGCGTAGTAGCAAATGTTGACGGGTACCGCACAAAGCTGACTGCTATTATTAATGTATTAATCAAG
TCACTGATACATCTTCGAAACCATTAACAGTGGCGCATGTAGACAATCTCAGATCTCTAATGGTCGAACT
TCATTCTGTGGTTACCAAAGCGGTCATGCTGGTCCCGGAGGGTGTGTGTCAGTAATGCTCCCCGAAACCCG
TCCCTGAAAAATAGTACATTCCTGGCCGAGATGTATCTATCGGCGATTCTTCACAGACTCAAGGGACTAA
TTATATATACAGCAGAACTGGGTGATTCTATAATCACGTCAATATCGACTATGACTAGCGGTATACTAGA
CCTTAAAAAGTTTTTCTTGTGCGATTTTCGGCCACACCGGGACGTTCTACCTGACGATATACCCGAGG
GGTGTGAGAGCGCACCGGCGTTTGGGGTATGGAGATTGACTGATATAGTGGATGCTGTGCGGGGGGGTTT
ACTGTGACATAGAAGGATCTAGATCAGACATTAGAGCGTATATTGCCACTCTCAGGAGTGATATGAAACA
AACAAGTGATGCCATTCGTGACTGCGAGACCATGATCGCGCATATCGAAGGATCTAAATTTGTGGATTCA
TTCAAGAATCTTCTAACAGCCCCATTCTAAATTAAGTATAGGATACAAACCGGACTCCTACTTAGAGCCGGCA
AGCTTTTGGTGGGATCGGAAGTCCCAGTCTCAAACACCTGACCACATTTCTAGGACGCTGGAGGAGTTT
AAGTAGCCGTTATACAAAGGTAACCTTACC GCCGATAACGTACCCGAAGCTGCTATTCTAGATATGGTG
ATAGACCTCCAAGGTATCTGGAATGGGATACAACATGATAAAGGTATGGCCCCCGGATTATATCTTACA
CGCGCCAAGTGCAGGAGGATGCCGTATTAATCTTTTGGGAGAATATTCGGAGGTTCTTGATGATGGGGT

CCCAACCGGAATTCCTGTCACTGGGAAGTCAAACATAGCGTCGTGGGATACCGTTGAATTGGATATATTA
 CGGAAAGGTGTGATAGCACCAAACGATATCGATGTGGTGGGGCCGACGAAATACTACTTACAAAATCCT
 GGGTTACCCAGAAAGACCTCCTCGCCGAAGTTGATTCTATCTTTAATGTTGGTTTTAATAAAGATACTCA
 ATGA

Anexo 4: Secuencia del gen *ul37* del VHF-1 y primer par de partidores diseñados *In silico*.

Sequence Name:
 UL37

Target Sequence:

```

1   ATGGATAATAGGGGACCCCTTATGACTCTAGTAGCCCTCCCTTGAAGGGCTAGTAGGGCTAGCCAGTGACAGACTAACCCAGGATGGTGTTCGGGGATAA
101  AGTCTATGATCTCTGAATTTTTTATCTACGGATTCTATAGAACTCCGGGATACGCCAAGATTATGGGCTAAGTTACAAAACACTAGCATGTGATGCCCTA
201  TTTACATACACGGAGCCCGGAGACCCGGTTTTGGCTGAAAATCTGCCAGGATTAATTTTTCTGGAGATTTAAACATGATTTGGACGGAGGCCAATTAAT
301  GATCTCACTGATATATCAACCTTATTGGATGTGATGAACGACGAGGAGTGTATGGCCGTGATAAAGTACGGCTGGGCTACGAGTATCTTCATTTCTGGGTC
401  CATCTAACATCTATCGGCTTGTAGTGAATGGATAGTCCCTATTTAAGGAGATATATCTAGGGGCTGTTAAATAAAAACCCCATCTGATGCATTAAACGAAAC
501  GCCTATATCATCCCTTGAATAAGTTTTCCAGAACCCCTCGTTTCCAGAGAAATTTGAACCTTCTATATGGCATGCCCTTTTCCAGGAGGGTTTACGTCGTATA
601  GCCATCAGAGCGAATTTGGTGGTACAGTTTTGGGGTTATGGTTCAAAGGACGAGATTTACGCTAACCCCACTCACCCGTCGGTTATATATGTTGGCTC
701  TAGTGGACGAAATTTTTCAAGATATCGAGCAAAACATCTACATACACTACGCTCGTTAGAGATTTTCTGGAATCACCAGGAGATTGACGAAGGAGCCCT
801  GGTACCTTTACAGGCGCCCTAATCTATCACCGGAACTGCTTATGAGGTTAGAATATCTCGGCAATAGCACATCAAAATCCCTTCATACCAATCCCTCAG
901  CCAGGAACCGGTGACTGTACGTTTACCCACGGACCCCGAGATTCTTACCGAAGCAGATCTAAATTTAGAGGCACTCCTTATCCACGTCACAGCAATTAATCA
1001  GACTATTAGATTCAAAGGACATCACCTATGAAGATGGATCCAAATACCATATGGAAATTTATGCGTTGAATGCACTACAATACATGGGAGGTTATCCAGCG
1101  GAGCACGAAATCCACATCAAGCCATAGAGGGCGCTTATTCAAGCAGGATTTACATCATTTCATTTGATGATGTTAGAACGGCCATCTCCGATAAATTTTTCC
1201  AAGGCCACGGATAAAGTAATATTAACCGACACTCTATCCAAAGACCTCTCTGGATGAGGGCCAAACAGGCAATTTGGCTGTGTTGCCATGGTGGGGACTTGA
1301  TATTTAAATAGTGCACACATTATGGAAATGGCTAGATTATATTAGACATTATACTACCCTCTCCGAGATTTACCTCTAGTATACGGAGACTTGCCTCGA
1401  TTCACTCGGTTTACCGAATGGTAGTGTGGAAACAGATCATAAGCCATTTGATGGCACCAAAACCATATATAGATTACATCAAAATTCGAGGGTGGTTTTT
1501  GAGACGGAGTTAAACTTGGTTGATCAGAGAGTGGTTACTGTGGAGGGTAAATACACAAACCCCTGCCAGAGAACTCACTTTAATGTGGTTGATTTCAAAG
1601  CGAGAGATCTATGGGGTATTCAAGTACAATATGATGCCATACAACCTGGTCAGGGTAGAGAACTGTCAGAACACAGTGTAGTGAAGTAGATCTTCTTTT
1701  GGGGGCTATACAGATAGAATATCCATCTATTGATGGAGTACCACATCATGTTCTATCTGAGCCAGCTTTTACCCCTTATCTATTATAACAGTACTTTTTG
1801  GATGCCCTACAGTACTGATCACCTCTAGATTTTCCGGCCAAAACACTAATAGATGTTATTAAAGTATGTACATGGCCCGAGATTATGGTATAGGGCTAG
1901  TAGCAAAATGTTGACGGGTACCCGACAAAGCTGACTGCTATTATTAAATGATTTAAATCAAGTCACTGATACATCTTCGAAAACCCATTAACAGTGGGGCATGT
2001  AGACAACTCAGATCTCTAATGGTCCGAACTTCATTTCTGTGGTTACCAAAGCGGTCATGCTGGTCCCGGAGGGTCTGTGCACTAATGCTCCCCGAAACACCG
2101  TCCCTGAAAAATAGTACATTCCTGGCCGAGATGTATCTATCGGGGATTTCTTCCAGACTCAAGGGACTAATATATATACAGCAGAACTGGGCTGATTCTA
2201  TAATCACGTCRAATATCGACTATGACTAGCGGTATACCTAGACCTTAAAAAAGTTTTTCTCTTGTGGATTTTCCGCCACACCCGGGAGCTTCTACCCCTGACGAT
2301  ATACCCGAGGGGTCTTCCAGAGCCACCCGGGCTTTCCGGGTATGGAGATTGACTGATATAGTGGATGCTCTCCGGGGGGGTTACTCTGACATAGAAAGATCT
2401  AGATCAGACATTAGAGCGGTATATTGCCACTCTCAGGAGTGATATGAACAAACAAAGTATGCCATTCTGACTGGGAGCCATGATCCGGCATATCGAAG
2501  GATCTAAATTTGTGGATTCATTCAAGAATCTTCTAACAGCCCAATTTCAAATTAAGTGGATACAAACCCGGACTCCTACTTAGAGCCCGCAAGCTTTTGGT
2601  GGGATCGGAAGTCCCGAGTCTCAAACACCTGACCCACATTTCTAGGACCGTGGAGAGTTTTAAGTAGCCGTTATACAAAGGTAACCTTCTACCCCGGATAAC
2701  GTACCCGGAAGCTGCTATTCTAGATATGGTATAGACCTCCAAAGGTATCTGGAAATGGGATACAAACATGATAAAGGTATGGCCCCCGGATTATATCTTTACA
2801  CCGGCCAAGTCCAGGAGGATGCCGTATTAATCTTTTGGGAGAATTTCCGAGGTTCTTGTATGATGGGGTCCCAACCCGGAATTTCTGCTACTGGGAAGTCT
2901  AAACATAGCGTCTGGGATACCCGTTGAATTTGGATATATTACGGAAAGGTGTGATAGCCAAACGATATCGATGCTGGTGGGGCCGAGAAATACTACTT
3001  ACAAAATCCTGGGTTACCCGAGAAAGCCTCCTCGCCGAAGTTGATTCTATCTTTAATGTTGGTTTTAATAAAGATACTCAATGA
  
```

Rank: 1 | Product Length: 318 | Product Region: 1794-2111

Primer Name	%GC	Strand	Size (bases)	Tm (°C)
<input type="checkbox"/> UL37 1 F	50.00	FWD	20	59.99
<input type="checkbox"/> UL37 1 R	45.00	REV	20	59.95
5' Addition		Primer Sequence		
		A G T T T G G A T G C C C T A C A C G		
		T T T T T C A G G G A C G G T G T T T C		

Highlight Target Sequence

Anexo 5: Secuencia del fragmento de 318 pb del gen *ul37* del VHF-1 y segundo par de partidores diseñados *In silico*.

Sequence Name:
UL37

Target Sequence:

```

1   AGTTTTGGATGCCCTACACGTACTGATCACCTCTAGATTTTCGGGCAAAACACTAATAGATGTTATTAAGGTATGTACATGGGCCCGAGATTATGGTATA
101 GGC GTAGTAGCAAATGTTGACGGGTACCGCACAAAGCTGACTGCTATTATTAATGTATTAATCAAGTCACTGATACATCTTCGAAACCATTAACAGTGG
201 CGCATGTAGACAATCTCAGATCTCTAATGGTCGAACTTCATTCTGTGGTTACCAAAGCGGTATGCTGGTCCCGAGGGTGTGTGAGTAATGCTCCCCGA
301 AACACCGTCCCTGAAAAA
  
```

Rank: 1 Product Length: 120 Product Region: 199-318				
Primer Name	%GC	Strand	Size (bases)	Tm (°C)
<input type="checkbox"/> UL37 1 F	50.00	FWD	20	59.83
<input type="checkbox"/> UL37 1 R	45.00	REV	20	59.95
5' Addition	Primer Sequence			
		G G C G C A T G T A G A C A A T C T C A		
		T T T T T C A G G G A C G G T G T T T C		

Highlight Target Sequence