



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

**DETECCIÓN DEL GEN DE LA GLICOPROTEINA C DEL VIRUS HERPES CANINO  
MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

**DETECTION OF THE GLYCOPROTEIN C GENE OF CANINE  
HERPES VIRUS BY POLYMERASE CHAIN REACTION**

**MARCO DAVID VARGAS VARGAS**

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 GLICOPROTEINA C DEL VIRUS HERPES CANINO  
MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

**DETECTION OF THE GLYCOPROTEIN C GENE OF CANINE  
HERPES VIRUS BY POLYMERASE CHAIN REACTION**

**MARCO DAVID VARGAS VARGAS**

NOTA FINAL: .....

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

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: CARLOS NAVARRO VENEGAS	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: JOSE PIZARRO LUCERO	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: MARIANA ACUÑA RETAMAR	.....	.....

SANTIAGO, CHILE

2013

**A** Armando  
Olaya

## **Agradecimientos**

Agradezco a todos los que participaron en esta etapa de mi vida que llega a su fin.

A los profesores que me entregaron los conocimientos que permitirán que me desarrolle en lo que siempre he deseado, en especial a mi profesor guía, Carlos Navarro Venegas, con el que, a pesar de los momentos complicados, he llegado a forjar una buena amistad. También a la profesora María Antonieta Jara, por su tierno apoyo y desinteresados consejos.

A mis compañeros de tesis por el apoyo brindado, en especial a Leydi Carrasco, por su apoyo, consejos y amistad.

A mis compañeros de carrera, gran parte de lo que soy ahora se lo debo a ellos. A mis compañeros de deporte, por los grandes momentos que compartimos, por su apoyo y compañía.

A mi compañera de vida, Laura Miranda, quien apareció en mi vida en el momento más oportuno y me entregó la fuerza necesaria para dar los últimos pasos.

Pero por sobre todos, agradezco a mi familia. A mi padre Armando Vargas, quien me ha enseñado a ser paciente, a disfrutar los detalles de la vida, a ser un hombre de bien y a mi madre Olaya Vargas, quien me entregó la fuerza para enfrentarme a la vida, que me enseñó a recorrer el camino de la verdad, que me mostró que nada es imposible, que si se actúa con rectitud, el alma siempre estará tranquila.

Finalmente, agradezco con toda el alma a mi hermana, Victoria Vargas, mi mejor amiga, mi compañera, mi madre sustituta. Nunca olvidaré la vida que compartimos en nuestra etapa universitaria.

Gracias a todos por permitir a un niño admirador de los animales convertirse en un médico veterinario de la Universidad de Chile.

## RESUMEN

La diferencia fundamental entre un virus y los microorganismos reside en la forma de generar prole, pues los virus no siguen la estrategia de formar nuevas partículas mediante fisión binaria. Su proceso de replicación es particular, pues considera la unión a la célula huésped, la exposición del genoma viral, la replicación del genoma, la producción de proteínas virales, el ensamblaje de la partícula viral y la salida al exterior de la célula. En esta última etapa, algunos virus destruyen la membrana celular produciendo un daño irreparable que lleva a la muerte celular, fenómeno denominado citólisis y que puede ser observado a través del microscopio óptico, lo cual permite un acercamiento al diagnóstico de su presencia.

El virus herpes es uno de los que presentan esta capacidad citolítica y ha sido descrito en insectos, reptiles, anfibios y moluscos; también en prácticamente todas las especies de aves y mamíferos que se han investigado.

Dentro de la medicina veterinaria se han descrito varios virus herpes de importancia, dentro de los cuales se encuentra el Virus Herpes Canino tipo 1 (CaHV1), debido principalmente al cuadro que ocasiona al infectar cachorros, pudiendo provocar la pérdida de camadas completas y en reproductores, ya que quedan como portadores de por vida. Lo anterior, se traduce finalmente en cuantiosas pérdidas económicas para los plantales, sobretodo si se trata de animales de alto valor genético. Debido a esto, es indispensable poder realizar un diagnóstico temprano.

En este estudio, se aportó tanto a la caracterización genómica de un aislado nacional del virus CaHV1 -denominado RP5, detectado y caracterizado biológicamente en el año 2005- como también a la medicina veterinaria de pequeños animales con un método diagnóstico específico, sensible y de rápido resultado. Para esto, se realizó la detección del gen de la glicoproteína C del CaHV1 mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando un par de primers diseñados *in silico*. Con la utilización de un termociclador de gradiente de temperaturas se estableció la temperatura de alineamiento (55°C) mediante la observación nítida e inequívoca de un fragmento de DNA de aproximadamente 200 pb. Estos fragmentos fueron secuenciados y se estableció un porcentaje de identidad nucleotídica de 95% respecto del dato oficial del GenBank. Este alto valor de identidad indica que el fragmento amplificado corresponde al fragmento del gen gC y constituye una evidencia más que confirma que el aislado nacional utilizado como fuente viral, corresponde a CaHV1.

**PALABRAS CLAVE:** Virus herpes canino, glicoproteína C, diagnóstico, *in silico*

## **ABSTRACT**

The fundamental difference between viruses and microorganisms resides in the way they generate progeny, due to the fact that viruses don't follow the binary fission strategy to form new particles. Their replication process considers union to the target cell, exposure of the viral genome, genome replication, viral protein production, viral particle assembly and exit to the cell exterior. In this last stage of replication, some virus destroy the cell membrane generating irreparable damage that leads to cell death, phenomenon called cytolysis and that can be observed through optical microscope, which allows a diagnostic approach of its presence.

Herpes virus presents this cytolytic capacity and has been described in insects, reptiles, amphibians and mollusks; also in practically all bird and mammal species that have been investigated.

In veterinary medicine there are many herpes virus of great importance, one of which is canine herpes virus type 1 (CaHV1), due mainly to the clinical syndrome it produces when puppies are infected, being able to cause the loss of whole litters and in the male and female, since they stay as lifelong carriers. This translates finally in substantial economic losses for the kennels , especially if it involves animals with high genetic value. Due to this, it is essential to carry out early diagnosis.

In this study, there has been a contribution to the genomic characterization of a national isolate of canine herpes virus (CaHV1) –called RP5, detected and characterized biologically in the year 2005- as well as to small animal clinic with a specific diagnostic method, sensible and of quick results. For this, the detection of the CaHV1 glycoprotein C gene was performed using the polymerase chain reaction (PCR), using a pair of primers designed *in silico* using an online free access program. With the use of a gradient temperature thermocycler we established the alignment temperature (55°C) through the observation of a clear and unequivocal fragment of DNA of 200pb approximately. These fragments were sent for their sequencing and afterwards a nucleotide identity percentage of 95% was established compared to the official data GenBank. This high value of identity it indicates us that the amplified segment corresponds to the gC gene fragment and constitutes one more evidence that confirms that the national isolate used as a viral source, is in fact CaHV1.

**KEYWORDS:** Canine Herpesvirus, Glycoprotein C, diagnosis, *in silico*

## 1. INTRODUCCION

### **El virus.**

El virus herpes canino tipo 1 (CaHV1) pertenece al orden *Herpesvirales*, familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus* (ICTV, 2009). La mayoría de los virus herpes que tienen importancia veterinaria pertenecen al género *Varicellovirus* (Carter *et al.*, 2006). Dentro de la familia *Herpesviridae* existen cuatro subfamilias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, *Gammaherpesvirinae* y una cuarta aún sin nombre (ICTV, 2009). Esta definición de grupos se basa en características biológicas y determinaciones moleculares tales como: secuenciación nucleotídica o análisis filogenético (Murphy *et al.*, 1999).

Los integrantes de la familia *Herpesviridae* presentan su genoma como una molécula lineal de DNA de doble hebra, cuyo tamaño se encuentra entre 125 y 235 mil pares de bases (pb). Poseen cápside de simetría icosaédrica de un tamaño de 125 nm que rodea esta doble hebra y que a su vez está envuelta por el tegumento, el cual corresponde a una capa amorfa de estructura proteica fibrosa. Todas estas estructuras están envueltas por una envoltura lipídica, cuya superficie no es regular, ya que presenta proyecciones que se distribuyen uniformemente. Finalmente, el tamaño de la partícula viral varía entre los 120 y 300nm (Madigan *et al.*, 2003; Carter *et al.*, 2006).

La subfamilia *Alphaherpesvirinae* tiene una amplia gama de hospederos a los cuales infecta realizando ciclos líticos en las células y produciendo un estado de infección latente, quedando inactivo principalmente en los ganglios sensoriales (Boehmer y Lehman, 1997), pudiendo reiniciar su propagación en eventos de estrés (Madigan *et al.*, 2003).

### **Replicación viral.**

En el proceso de replicación del virus en la célula se distinguen cinco etapas, las cuales ordenadas cronológicamente son: adsorción, penetración, síntesis de ácido nucleico y proteínas, ensamblaje y finalmente liberación, que conlleva lisis celular. Una vez dentro de la célula, el virus estimula a la célula a sintetizar los elementos necesarios para su replicación (Murphy *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 2003). Las células susceptibles a ser infectadas están determinadas por la interacción, en la adsorción, entre los receptores presentes en las células y proteínas virales, la cual posee una alta especificidad. Sin embargo, aun cuando el virus haya penetrado a la célula, esto no garantiza la multiplicación viral, ya que aun no se han producido las copias del genoma viral y por lo tanto tampoco se han sintetizado las proteínas específicas del virus (Madigan *et al.*, 2003).

Existen tres mRNA sintetizados en el proceso de la replicación viral: el temprano inmediato ( $\alpha$ ) que codifica proteínas reguladoras; el temprano retardado ( $\beta$ ) que codifica proteínas que participan en la replicación de DNA y el tardío ( $\gamma$ ) que codifica proteínas estructurales de la partícula viral. A partir de estos mRNA se sintetizan proteínas tempranas y proteínas tardías, las primeras se sintetizan inmediatamente después de producida la infección y son necesarias para la replicación de los ácidos nucleicos virales; las tardías se sintetizan después, entre las cuales se encuentran las glicoproteínas de la cubierta del virus, como las glicoproteínas B y C (Murphy *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 2003).

### **Glicoproteína C.**

La glicoproteína C está codificada por el gen gC de CaHV1 y desde el punto de vista de la respuesta inmune poseería un importante rol, pues ha sido descrita como el receptor involucrado en el reconocimiento de células infectadas por virus herpes por factores del complemento (Friedman *et al.*, 1984; Reubel *et al.*, 2002). Por otra parte, desde la perspectiva del control de la infección, la utilización de una vacuna recombinante que exprese los genes gB, gC y gD, podrían ser de alta utilidad (Xuan *et al.*, 1997).

El gen gC está constituido por 1380 pb y su secuencia nucleotídica está disponible en bases de datos oficiales (Genbank AF361074.1). Así, el establecimiento de un protocolo de PCR convencional para detectar gC puede ser obtenido utilizando algunas herramientas bioinformáticas como el diseño *In silico* de partidores, pues su detección mediante esta técnica molecular –al parecer- no ha tenido la misma difusión que la información respecto de las secuencias nucleotídicas de varios genes de CaHV1 (Limbach *et al.*, 1994; Tyack *et al.*, 1997; Reubel *et al.*, 2002)

### **Virus y enfermedad asociada.**

Existen perros infectados con virus herpes en todo el mundo, estos se concentran en colectividades caninas, albergues, hoteles caninos, estabularios y sobretodo en criaderos, donde la seroprevalencia puede superar el 90%. En estos lugares la mitad de los animales seropositivos presentan trastornos reproductivos (Dumon y Mimouni, 2005).

Una característica importante para el control de este virus es su fragilidad, ya que su envoltura glicoproteica lipídica es fácilmente destruida por el calor, la luz ultravioleta, solventes lipídicos y los desinfectantes comunes (Murphy *et al.*, 1999). Se inactiva fácilmente a temperaturas superiores a 40°C, aun cuando la temperatura óptima para su replicación y por lo tanto lisis celular se encuentra entre 32 y 33 °C (Dumon y Mimouni, 2005).

La transmisión viral se realiza a través del contacto entre mucosas, por lo tanto requiere de contacto estrecho entre un animal infectado que esté liberando el virus y uno susceptible, esto ocurre durante el coito, cuando realizan lamidos o cuando las madres acarician a las crías. Cuando muchos animales habitan en un espacio reducido, la forma más importante en la que el virus pasa de un individuo a otro es mediante la propagación de aerosoles de origen respiratorio a corta distancia (Murphy *et al.*, 1999).

En los cachorros existen dos formas de presentación, una que se caracteriza por presentar una mortalidad fulminante, denominada superaguda y una presentación aguda, que es la más habitual, la cual en un comienzo se presenta como trastornos digestivos, anorexia, heces líquidas de color grisáceo, vómitos y quejidos continuos por dolor abdominal; y que más adelante evoluciona a síntomas nerviosos de encefalomiелitis seguidos de coma y muerte. La forma fulminante se caracteriza por ser de corta duración y muy severa, con un 80% de mortalidad en animales menores de una semana y los cachorros infectados sobrevivientes presentan secuelas cerebelosas y articulares irreversibles. Cuando el virus infecta cachorros de mayor edad y adultos, el cuadro clínico provocado consta de otros signos patológicos, que se manifiestan cuando la presencia viral es acompañada por otros factores, como una infección bacteriana y fenómenos de estrés: afecciones oculares y rinofaríngeas que se manifiesta clínicamente como “tos de la perrera”. En el caso de las hembras produce una leve vaginitis; cuando se infecta el útero grávido se producen abortos, problemas en la parición e infertilidad (Murphy *et al.*, 1999; Dumon y Mimouni, 2005; Carter *et al.*, 2006).

### **Métodos Diagnósticos y sus inconvenientes**

Al realizar la necropsia a cachorros infectados se encuentran petequias en hígado, bazo, pulmones y riñones. En estos órganos afectados o en secreciones, se pueden verificar lesiones características a nivel histológico como los cuerpos de inclusión intranucleares o bien, utilizar la técnica de inmunofluorescencia directa que detectará el antígeno viral. No obstante, el aislamiento viral en células permisivas constituye el *gold estándar* o diagnóstico definitivo.

Lamentablemente, lo anterior se logra -en general- al mes de iniciado el estudio, por lo cual se hace necesario disponer de una técnica más rápida como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual corresponde a una prueba molecular muy sensible y específica que detecta parte del genoma específico del patógeno estudiado (Erles *et al.*, 2004; Ronsse *et al.*, 2005; Dumon y Mimouni, 2005; Carter *et al.*, 2006).

Básicamente, la técnica de PCR consiste en la síntesis *in vitro* de una secuencia blanco de DNA de manera repetitiva, gracias al uso de partidores o *primers* (secuencia de

oligonucleótidos altamente específica) que reconocen secuencias que flanquean el segmento del genoma a amplificar. Esto se logra mediante el uso de la *Taq polimerasa*, enzima de la bacteria *Thermophilus aquaticus* que es capaz de incorporar nucleótidos libres al extremo 3' del partidor, generando copias de la secuencia blanco de manera exponencial, en intervalos cortos de tiempo y a temperaturas elevadas. Se caracteriza por su termoestabilidad, su alta procesividad y fidelidad (Mullis y Faloona, 1987).

Así, la técnica de PCR se basa en la repetición consecutiva de 3 pasos básicos, que en conjunto conforman un ciclo. Primero, el DNA blanco se desnatura, generando hebras simples. Este proceso se lleva a cabo a temperaturas que varían entre los 90 y 96°C. El segundo paso es la hibridación o *annealing* en el cual los partidores, se unen a sus fragmentos complementarios en estas hebras simples. La temperatura de esta etapa es específica de cada partidor. La tercera y última etapa es la síntesis del DNA, mediante la elongación de los partidores, gracias a la acción de una polimerasa termoestable, la cual comenzando desde los partidores, se une a la hebra blanco y adiciona nucleótidos que formarán la hebra complementaria a ésta. El resultado son dos hebras dobles de DNA: la hebra original y la nueva hebra formada, las cuales servirán la hebra blanco o molde del ciclo siguiente. Este proceso se repite entre 20 y 40 veces (Mullis y Faloona, 1987).

Al finalizar la serie de ciclos se generarán millones de copias de una zona del DNA original, las cuales son visualizadas como bandas al realizar una electroforesis, en la que el DNA se separa de acuerdo a su peso molecular y su carga eléctrica negativa. Las moléculas de DNA son depositadas en un gel de poliacrilamida o agarosa inmerso en una solución tampón, que es sometido a un campo eléctrico. La concentración de la agarosa determina la velocidad con la que se desplazan las moléculas de interés, pues mientras menor es el tamaño de los productos de la reacción, más concentrado debe utilizarse el gel, de esta forma, para PCR diagnóstico generalmente se utilizan concentraciones de agarosa al 2% (Danchin y Yuek, 2002; Pennington, 2002; Mullis y Faloona, 1987).

### **Situación en Chile.**

En 1992 se sugirió la presencia del CaHV1 por la presentación de muerte perinatal en un criadero de la Región Metropolitana, ya que al realizar la necropsia de los cachorros se observaron petequias en riñón e hígado y se observó gran cantidad de cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos. Se realizó un cultivo de líneas celulares de riñón equino que presentó el efecto citopático característico del virus herpes, sin embargo el virus no fue aislado (Larenas *et al.*, 1992). Posteriormente se detectó y caracterizó biológicamente un aislado

nacional denominado RP5 (Navarro *et al.*, 2005). Sin embargo, desde esa fecha no se habían realizado estudios tendientes a la caracterización molecular del virus aislado.

En este contexto y en paralelo a otras memorias de título que investigaron la presencia de los genes UL37, de Timidin quinasa (TK) y de glicoproteína B del virus Herpes canino tipo 1, en este estudio se implementó la detección de un fragmento de DNA constitutivo del gen de la glicoproteína C (gen gC), descrita como el receptor involucrado en el reconocimiento de células infectadas por virus herpes, por factores del complemento (Friedman *et al.*, 1984), contribuyendo así tanto a la caracterización molecular del aislado RP5 como también a disponer de una tercera alternativa molecular para el diagnóstico del virus herpes canino en Chile.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

Esta memoria de título 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.

### **2.1.- Muestras.**

El virus utilizado en esta memoria fue el aislado nacional RP5 (sobrenadante de cultivo celular infectado) mantenido a -80°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 *Salmonella enteritidis* y DNAC del virus distemper canino. Como control de reactivos se utilizó agua libre de nucleasas (ALN).

### **2.2.- Reacción de la polimerasa en cadena (PCR).**

**a) Detección del gen de la glicoproteína C.** (Reubel *et al.*, 2002) (secuencia en Anexo 1).

a) Partidores. El diseño experimental utilizado en este trabajo contempló el diseño *in silico* de los partidores: PMV1: 5'-AACAAAATGGCTCCACCAA-3' y PMV2 5'-CCACCCTGGTTTGG TCAATA-5'. Estos partidores fueron obtenidos utilizando un *software* de libre acceso (programa *on line*: *OligoPerfect™ Designer*) en el cual al ingresar la secuencia oficial del gen gC entrega tanto un ranking de pares de partidores en base a la estabilidad y propiedades termodinámicas de la unión entre bases complementarias como también el tamaño del fragmento a amplificar, en este caso 202 pb y las temperaturas de fusión (Tm) de cada partidor (ver Anexo 2 y 3). Una vez diseñados *in silico*, su síntesis se encargó a la empresa Bioscan.

**b) Mezcla de reacción.** La mezcla de reacción consistió en 15 uL de Master Mix 2X PCR (Anexo 4), 5 uL de cada uno de los partidores (1  $\mu$ M) y 5  $\mu$ L del aislado nacional RP5, obteniendo un volumen final de 30 uL en un tubo de 0,2 mL.

**c) Protocolo de PCR. Condiciones experimentales.**

Para la determinación de la temperatura óptima de alineamiento de los partidores utilizados, se utilizó un termociclador de gradiente de temperaturas (Px2 Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation), facilitado por el Dr. Pedro Smith, del Departamento de Patología Animal de nuestra Facultad, que permite realizar la etapa de alineamiento a una temperatura conocida e individual por cada columna de pocillo del termociclador.

Así, el protocolo del PCR utilizado contempló una desnaturación inicial a 95°C por 2 minutos y luego 40 ciclos que incluyeron la desnaturación a 95°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 (50°C; 61°C).

**2.3.- Detección de productos amplificados.**

Para detectar el producto amplificado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Winkler ®) en tampón Tris-borato (90 mM Tris-borato, 10 mM EDTA) como solvente. El producto de PCR se mezcló en una razón de 6:1 con un tampón de carga (6X Mass Ruler Loading Dye Solution; Fermentas ®). Se depositaron 6 uL de esta mezcla en el pocillo respectivo del gel. El protocolo usado para la electroforesis consistió en 90 V durante 90 minutos. El marcador de tamaño molecular (MTM) contenía fragmentos de DNA entre 100 y 1000 pares de bases (HyperLadder IV, Bionline ®). Luego de la electroforesis, el gel se incubó en bromuro de etidio (0.5 ug/ml; Fermelo®) durante 30 minutos, posteriormente se observó en un transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminador UVP®) y se fotografió la imagen resultante mediante cámara digital.

**2.4.- Obtención de secuencias nucleotídicas.**

**a) Purificación de amplicones:** Se utilizó el kit comercial *HiYield PCR DNA fragments extraction kit* (Bioscience®). Se transfirió 100  $\mu$ l de la mezcla de la reacción a un tubo de micricentrífuga, se añadió cinco volúmenes de Tampón DF, y se homogenizó en vórtex. Se aplicó la mezcla a una columna DF ensamblada en un tubo de plástico de 2 ml. Se centrifugó a 10000xg durante un minuto a temperatura ambiente y se eliminó el líquido residual. Luego se agregó 600  $\mu$ l del tampón de lavado diluido en etanol absoluto y se centrifugó a 10000xg durante un minuto a temperatura ambiente. Se eliminó el líquido residual y se volvió a colocar

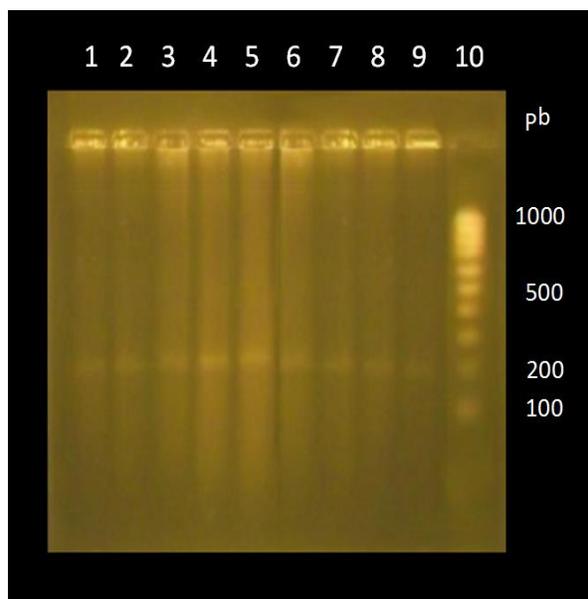
la columna en el tubo. Se centrifugó la columna vacía durante dos minutos a temperatura ambiente. Se colocó en un tubo plástico de 1,5 ml y se agregó 30µl de agua libre de nucleasas. Se incubó durante dos minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 10000xg durante dos minutos para eluir el DNA.

**b) Secuenciación:** Se enviaron 3 muestras de ADN obtenido (duplicado) en concentración aproximada de 50 ng/µl, a la empresa Genytec. Las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando el programa *online* gratuito *Clustal W* para obtener una secuencia consenso, la cual fue ingresada como dato al programa software *online* gratuito BLAST ® (*Basic Local Alignment Search Tool*) para conocer el porcentaje de identidad nucleotídica (PIN) respecto de secuencias nucleotídicas disponibles en la base de datos Genbank.

## RESULTADOS

### 1.- Detección del gen de la glicoproteína C del VHC en muestras del aislado RP5.

Al visualizar bajo luz UV el gel de agarosa al 2% fue posible observar una banda de DNA de alrededor de 200 pb en todas las distintas temperaturas de alineamiento, siendo las más nítidas en los carriles 4 y 5, correspondientes a las temperaturas de alineamiento de 55 y 56°C respectivamente, como se observa en la Figura 1.



Carril	Temperatura alineamiento
1	52°C
2	53°C
3	54°C
4	55°C
5	56°C
6	57°C
7	58°C
8	59°C
9	60°C
10	MTM

MTM: Marcador de tamaño molecular (100-1000 pb)

**Figura 1.** Electroforesis (Agarosa, 2%). PCR en gradiente de temperaturas (52°C →60°C).

## 2.- Determinación de la identidad nucleotídica del fragmento visualizado en el carril 4:

Los amplicones obtenidos fueron enviados a la empresa Genytec, para realizar su secuenciación. Las secuencias obtenidas se muestran en el anexo 5.

Mediante el programa ClustalW (ver Anexo 6) se obtuvo la siguiente secuencia consenso:

>MDVV

ACCACCCTGGTTTGGTCAATATTCATAATAATATAGATATTTCCGATTATCATGAACCTGTTACCTATAA  
TGTTCAATTATTGGTTATCCAATAATTTTTCCCAACTTTTATGATGAAAAGGAGTTTGATCCATCGGATG  
AAAATGAAAGTAAATCGATGTTTCATAAGTATTACCACAATAATTGGTGGAGCCATTTTTGTT

Al ingresar la secuencia MDVV al programa BLAST ®, se obtuvo un PIN de 95% respecto de las únicas dos secuencias de todas las presentes en la base de datos del Genbank que presentaron similitud con la secuencia MDVV, ambas secuencias corresponden al gen gC del CaHV1.

### Discusión.

Existen varios métodos de acercamiento al diagnóstico de infección por CaHV1-1, destacándose tanto el examen clínico en animales vivos como también la necropsia y estudios histopatológicos en animales muertos. Sin embargo, estos métodos no son definitivos, pues solo sugieren la presencia del virus. Así, el diagnóstico definitivo sigue siendo el aislamiento viral, el cual tarda alrededor de un mes.

Si se comparan estos métodos diagnósticos con un protocolo de PCR resulta evidente que este último, presenta ventajas considerables: mayor especificidad, debido a que detecta la presencia de un fragmento de DNA específico perteneciente a un gen determinado del patógeno en cuestión, mayor sensibilidad, ya que en cada ciclo se genera un aumento exponencial del producto a detectar y por último, la obtención más rápida de resultados (Erles *et al.*, 2004; Ronsse *et al.*, 2005; Dumon y Mimouni, 2005; Carter *et al.*, 2006; Mullis y Faloona, 1987).

En este contexto, actualmente en FAVET se han implementado 2 métodos que involucran la técnica del PCR convencional para el diagnóstico del CaHV1: la detección del gen UL37 (Fuentes, 2010) y la del gen gB (Carrasco, 2010). Paralelamente, está en desarrollo una cuarta memoria de título que detectó el gen de la timidina quinasa (TK) mediante la utilización de un PCR anidado (Jara, 2013, datos aun no publicados). Estos métodos, en conjunto al aquí presentado -que involucró el diseño de partidores *in silico*, la determinación de la temperatura de alineamiento y la visualización de un fragmento de DNA de alrededor de 200 pb- se orientan

en la búsqueda de un método definitivo de diagnóstico molecular del CaHV1 de utilidad en la Medicina de Pequeños Animales.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede establecer que el diseño de los partidores *in silico* (PMV1 y PMV2) resultó ser una estrategia exitosa, en conjunto con la determinación de la temperatura de alineamiento de 55°C utilizando el termociclador de gradiente de temperaturas. Lo anterior confirmado por la visualización nítida de un único fragmento de DNA de alrededor de 200 pb en el gel de agarosa al 2%.

Adicionalmente, el uso del programa *on line* BLAST®, permitió corroborar –a través de un alto valor de PIN- que el fragmento de DNA de 200 pb obtenido es constitutivo del gen gC de CaHV1 (anexos 7 y 8), un gen conservado codifica para la glicoproteína C del CaHV1, reconocida por su capacidad de estimular la respuesta inmune celular en el hospedero, siendo importante en la activación de la respuesta celular, mediada por linfocitos T (Arsenakis *et al.*, 1986; Rosenthal *et al.*, 1987 Mikloska y Cunningham, 1998).

Sin embargo, si bien el método implementado permitió la detección molecular del CaHV1 y complementa el estudio molecular del aislado RP5 nativo, aun no es posible determinar cuál de los protocolos de PCR mencionados sería el de elección para el diagnóstico definitivo, al no disponer aún de la información relativa a la detección del gen de la timidin quinasa de CaHV1.

Al disponer finalmente de una detección temprana del CaHV1 mediante PCR, se implementaría el diagnóstico de una infección que se orienta a dar solución a un problema actual de dos vertientes: una relacionada con el bienestar animal o de tipo afectivo y la otra de carácter económico. En el primer caso, se podría evitar la alta mortalidad observada en los cachorros menores de cuatro semanas, como también -mediante un diagnóstico oportuno- evitar la cruce de los animales infectados. Con respecto al segundo aspecto, es evidente que un animal infectado en un criadero se traduce en cuantiosas pérdidas a futuro, por concepto de abortos y muertes neonatales. Aun más, como los individuos infectados quedan como portadores de por vida, los reproductores afectados deben ser retirados definitivamente del criadero.

En conclusión, el protocolo de PCR utilizando como blanco de detección el gen de la glicoproteína C puede ser utilizado como método diagnóstico del CaHV1. Sin embargo, para definir el método molecular óptimo, se recomienda realizar a corto plazo, un estudio comparando la sensibilidad del PCR para cada uno de los genes del CaHV1 detectados. Adicionalmente, este estudio aportó a la caracterización genómica del aislado nacional RP5 al detectar el gen de gC del virus herpes canino en su genoma.

## BIBLIOGRAFÍA

**ARSENAKIS, M.; TOMASI, L. ; SPEZIALI, V. ; ROIZMAN, B.** 1986. Expression and regulation of glycoprotein C gene of herpes simplex virus 1. *J. Gen Virol.* 58(2): 367-376

**BLAST. BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL.** 2013. [en línea]. <[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST\\_PROGRAMS=megaBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome)> [consulta: 19-09-2013]

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

**CARRASCO, L.** 2010. Detección del gen B del virus herpes canino. Memoria de título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. Pp: 1-44

**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](http://www.ivis.org)), Ithaca, New York, USA.

**CLUSTALW. MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMNT.** 2013. [en línea]. <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>> [consulta: 19-08-2013]

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

**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).

**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.

**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

**FRIEDMAN, H., COHEN, G., EISENBERG, R., SEIDEL, C., CINES, D.** 1984. Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 acts as a receptor for the C3b complement component on infected cells. *Nature* 309: 633 – 635.

**ICTV. INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES.** 2009. Virus Taxonomy [en línea]. <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>> [consulta: 19-12-2009]

**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.

**LARENAS, J.; SANTIBÁÑEZ, M.C.; BERRÍOS, P.** 1992. Primeros antecedentes en Chile de infección por herpes canino con mortalidad neonatal. *Mevepa* 1: 13-16.

- LIMBACH, K.J.; LIMBACH, M.P.; CONTE, D.; PAOLETTI, E.** 1994. Nucleotide sequence of the genes encoding the canine herpesvirus gB, gC and gD homologues. *J. Gen. Virol.* 75:2029-39.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J.** 2003. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª ed. Ed. Pearson. Madrid, España. 1011 p.
- MIKLOSKA, Z.; CUNNINGHAM, A.L.** 1998. Herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gC and gD are major targets for CD4 T-lymphocyte cytotoxicity. *J Gen Virol* 79: 353–361, 1998.
- MULLIS, K.; FALOONA, F.** 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
- MURPHY, F.A.; GIBBS, E. P.J.; HORZINEK, M.C; STUDDERT, M.J.** 1999. Veterinary virology. 3th ed. Ed. Academic Press. London, Inglaterra. 629 p.
- NAVARRO, C.; CELEDÓN, M.; PIZARRO, J.; GAGGERO, A.** 2005. Virus herpes canino en Chile: Propiedades biológicas. *Arch Med Vet* 37: 133-137.
- NCBI. 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](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=nucleotide&dopt=GenBank&list_uids=13958998)> [consulta: 01-01-2010].
- PENNINGTON, T.** 2002. Electrophoretic typing. In SUSSMAN Molecular medical microbiology. Barcelona. España. Academic Press. Pag; 535-547
- REUBEL, G.H.; PEKIN, J.; WEBB-WAGG,K.; HARDY,C.M.** 2002. Nucleotide sequence of glycoprotein genes B, C, D, G, H and I, the thymidine kinase and protein kinase genes and gene homologue UL24 of an Australian isolate of canine herpesvirus. *Virus Genes* 25:195-200
- 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
- ROSENTHAL,K.L.;SMILEY,J.R.; SOUTH,S.; JOHNSON, D.C.** 1987. Cells Expressing Herpes Simplex Virus Glycoprotein gC but Not gB, gD, or gE Are Recognized by Murine Virus Specific Cytotoxic T Lymphocytes. *J. Gen. Virol* 61(8): 2438-2447, 1987.
- THOMPSON, J.; HIGGINSS, D.; GIBSON, T.** 1994. Clustal W: Improving the sensitivity progressive multiple sequence alignments through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680
- TYACK, SG., STUDDERT, MJ., JOHNSON, MA.** 1997. Nucleotide sequence of canine herpesvirus homologues of herpes simplex virus type 1 US2, US3, glycoproteins I and E, US8.5 and US9 genes. *DNA Seq.* 7(6): 365-8.
- XUAN, X., KOJIMA, A., MURATA, T., MIKAMI, T., OTSUKA, H.**1997. Analysis of canine herpesvirus gB, gC and gD by a recombinant vaccinia virus. *Arch. Virol.*142(5):1003-10.

**Anexo 1:** Secuencia del gen gC (Reubel *et al.*, 2002).1380 pb

```

ATGAGTTTTAAAAATTTTTATCTAATATATGTAATTATAATTTTTATAAACTCGATAATAACTTCAGCATC
TACATCCAAACCTTCAACACCTACCATAAATCCAACCTTCAGCAAATGAATCACCTGCTTCCATAGATACAA
CTATAACAAAACCTATATCTACAGAGGCCAAATAATTTAAAAATCAGTAAGTACCTCAATTAACCACCTAAA
AACTTAAAAAATAAATTAATCTAAATGTAGAGATAATGTTATTTATAGGCCATATTTTAGTCAATT
AGAAATTAAGTGTACTATAACTAAAAAGCAAAATTTAAGTAATCCTTTAATTGAGTTATGGTTTAAAGAAC
TTTCTACATATAATAAAAACCAATGAAAATGTTGAAAAGTTAAAAACAGATATATCAAAAAATATTTTATTA
TTTTTCGACAAAAAATAATAGTGATAACTTTTTATAATGATTTTTTTATTAGGTATACAAAAATCAACCAGTAAA
TTATAAATTTTACGGTTCCCAATTTTATGATAATGGAAACATATTACTAAATATAAAGTCGGTTGACTTTA
AAACCTCTGGAATATATACTTGGAAAGTATATAATCAAATAATGAAAGTATTTTTGAACTTTTAAAAAT
CAAGTATATGCATATCATTTCCCAAATGTAAACTTAAAAATCAAACCCAAGTTTATATAATGAAAACCTACG
CGTATTTGTACAATAGCAAATTACTTTCCCATGGAATCTACGGAAATATTTTGGTTTAAACGATGGACAAC
CTATTGATAAAAAATATATAGATGAAACTTATAGTGTATGGATTGACGGTCTTATAACACGCACCTCAATA
TTATCCCTTCCCTTTTCCGAAGCCATGGAAAAGCCCCCAATTTGCGATGTAATGTTGAATGGTATAAAAA
TTCAAAAGCCCTCAAAAAAATTTTCAAATACCGTTATTCCAAAAGTTTACTATAAACTTTTATATCTATAA
AATTTGATAATGGTTTAGCTATTTGTGATGCTAAATGTGTTTCCCGTGAAAATAATAAATTACAATGGTTA
GTTAAAGATATACCTATAAATGGTGATGATATTATAAGCGGCCCTGTTTAAACCACCTGGTTTGGTCAA
TATTCAAAATAAAATAGATATATCGGATTATGATGAACCTGTTACCTATAAATGTTCAATTATTGGTTATC
CAATAATTTTCCCAACTTTTATGATGAAAAGGTGTTTGTATGCATCGGATGAAAATGTTAGTAAATCGATG
TTAATAAGTATTACCACAATAATGGTGGAGCCATTTTGTATAGTATTGATTTTTATAACAGCTTTATG
TTTTTATTGTTCAAAAAATAATAAGATCTAA
    
```

**Anexo 2:** Zona de unión de partidores. Programa *on line*, OligoPerfect™ Designer by *life technologies*).

Target Sequence:											
	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
1	ATGAGTTTTAAAAATTTTT	ATCTAATATATGTAAT	TATAATTTTTATAAACT	CGATAATAACTTCAGCATC	TACATCCAAACCTTCAACACCT	ACCATAAATCCAACCTTCAGCAAAT	GAATCACCTGCTTCCATAGATACAA	CTATAACAAAACCTATATCTACAGAGGCCAAATAATTTAAAAATCAGTAAGTACCTCAATTAACCACCTAAA	AACTTAAAAAATAAATTAATCTAAATGTAGAGATAATGTTATTTATAGGCCATATTTTAGTCAATT	AGAAATTAAGTGTACTATAACTAAAAAGCAAAATTTAAGTAATCCTTTAATTGAGTTATGGTTTAAAGAAC	
101	TTTTCTACATATAATAAAAACCAATGAAAATGTTGAAAAGTTAAAAACAGATATATCAAAAAATATTTTATTA	TTTTTCGACAAAAAATAATAGTGATAACTTTTTATAATGATTTTTTTATTAGGTATACAAAAATCAACCAGTAAA	TTATAAATTTTACGGTTCCCAATTTTATGATAATGGAAACATATTACTAAATATAAAGTCGGTTGACTTTA	AAACCTCTGGAATATATACTTGGAAAGTATATAATCAAATAATGAAAGTATTTTTGAACTTTTAAAAAT	CAAGTATATGCATATCATTTCCCAAATGTAAACTTAAAAATCAAACCCAAGTTTATATAATGAAAACCTACG	CGTATTTGTACAATAGCAAATTACTTTCCCATGGAATCTACGGAAATATTTTGGTTTAAACGATGGACAAC	CTATTGATAAAAAATATATAGATGAAACTTATAGTGTATGGATTGACGGTCTTATAACACGCACCTCAATA	TTATCCCTTCCCTTTTCCGAAGCCATGGAAAAGCCCCCAATTTGCGATGTAATGTTGAATGGTATAAAAA	TTCAAAAGCCCTCAAAAAAATTTTCAAATACCGTTATTCCAAAAGTTTACTATAAACTTTTATATCTATAA	AATTTGATAATGGTTTAGCTATTTGTGATGCTAAATGTGTTTCCCGTGAAAATAATAAATTACAATGGTTA	
201	GTTAAAGATATACCTATAAATGGTGATGATATTATAAGCGGCCCTGTTTAAACCACCTGGTTTGGTCAA	TATTCAAAATAAAATAGATATATCGGATTATGATGAACCTGTTACCTATAAATGTTCAATTATTGGTTATC	CAATAATTTTCCCAACTTTTATGATGAAAAGGTGTTTGTATGCATCGGATGAAAATGTTAGTAAATCGATG	TTAATAAGTATTACCACAATAATGGTGGAGCCATTTTGTATAGTATTGATTTTTATAACAGCTTTATG	TTTTTATTGTTCAAAAAATAATAAGATCTAA						
301	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
401	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
501	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
601	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
701	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
801	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
901	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
1001	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
1101	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
1201	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
1301	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	

**Anexo 3:** Secuencias y Tm de partidores y tamaño del amplicón generado. Programa *online*, OligoPerfect™ Designer by *life technologies*).

Rank: 1   Product Length: 202   Product Region: 1119-1320					
Primer Name	%GC	Strand	Size (bases)	Tm (°C)	
<input type="checkbox"/> 1 F	50.00	FWD	20	60.61	
<input type="checkbox"/> 1 R	40.00	REV	20	60.34	
5' Addition	Primer Sequence				
	C C A C C C T G G T T T G G T C A A T A				
	A A C A A A A A T G G C T C C A C C A A				

**Anexo 4.** Contenido del kit “2X PCR Master Mix” (Fermentas®).

Compuesto	Cantidad
DNA <i>Taq</i> Polimerasa (recombinante)	0,05 U/μL
Tampón de reacción	
MgCl <sub>2</sub>	4 mM
Dexosinucleótido tri-fosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,4 mM de cada uno

**Anexo 5.** Secuencias obtenidas de los amplicones enviados a Genytec.

```

>MV1
TTCATCCCACCCTGGTTTGGTCAATATTCATAATATTATAGATATTTCCCATTCATGAACCTGTTAGCTA
TATATGTAGAATTATTGGTTATGCAATAAATTTTCCCAACTTATATGATGAAAAGGAGTTTGATCCATCGGA
TGAAAATGTAAGTAAATCCATGTTCAAAGTATTACCACAATAATTGGTGGAGCCATTTTTGT
>MV2
TCTAACCCACCCTGGTTTGGTCAATATTCATAAAAAATACATATTTCCGATTATCATGAACCTGTTACCTAT
AAATGTTCAATTATTGGTTATCCAATAATTTTCCCAACTTTTATGATGAAAAGGAGTTTGATCCATCGGAT
GAAAAGAAAGTTTATCGATGTTTATAAGTATTACCACAATAATTGGTGGAGCCATTTTTGTT
>MV3
ACCACCCTGGTTTGGTCAATATTCATAATAATATTGATATTTCCGATTATCATGAACCTGTTACCTATAAAT
GTTCAATTATTGGTTATCCAATAATTTTCCCAACTTTTATGATGAAAAGGAGTTTGATGCATCGGATGAAT
ATGAAAGTAAATCGATGATCATAAGTATTACCACAATAATTGGTGGAGCCATTTTTGTTACCGTTTAA
>MV4
ACCACCCTGGTTTGGTCAATATTCATAATAATATAGATATTTCCGATTATCATGAACCTGTTACCTATAAAT
GTTCAATTATTGGTTATCCAATAATTTTCCCAACTTTTATGATGAAAAGGAGTTTGATCCATCGGATGAAA
AAGAAAGTTAATCGATGTTTATAAGTTTACCACAATAATTGGTGGAGCCATTTTTGTTACCTTTA
>MV5
TCCACCCTGGTTTGGTCAATATTCATTTTAAATATAGATATTAGCGATTATCATGAACCTGTTACCTATAAAT
GTTCAATTATTGGTTATCCAATAATTTTCCCAACTTTTATGATGAAAAGGAGTTTGATCCATCGGATGAAA
ATGAAACAAAATCGATGTTTATAAGTATTACCACAATAATTGGTGGAGCCATTTTTGTTTTTTCAG
>MV6
AACCTCCACCCTGGTTTGGTCAATATTCATAATAATATAGATATTTCCGATTATCATGAACCTGTTACCTAT
AAATGTTCAATTATTGGTTATCCAATAATTTTCCCAACTTTTATGATGAAAAGGAGTTTGATCCATCGGAT
GAAAATGAAAGTAAATCCATGTTTATAAGTATTACCACAATAATTGGTGGAGCCATTTTTGTT

```



## Anexo 8: Alineamiento de secuencia MDVV y secuencias oficiales del Genbank®

Canine herpesvirus glycoprotein C (gC) gene, complete cds  
 Sequence ID: [gb|AF361074.1](#) Length: 1380 Number of Matches: 1

Range 1: 1118 to 1320 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
313 bits(169)	4e-82	192/203(95%)	1/203(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACCACCCTGGTTTGGTCAATATTCATAATAATATAGATATTTCCGATTATCATGAACCTG	60		
Sbjct 1118	ACCACCCTGGTTTGGTCAATATTCAAAAATAAAATAGATATATCGGATTATGATGAACCTG	1177		
Query 61	TTACCTAT-AATGTTCAATTATTGGTTATCCAATAATTTTTCCCAACTTTTATGATGAAA	119		
Sbjct 1178	TTACCTATAAATGTTCAATTATTGGTTATCCAATAATTTTTCCCAACTTTTATGATGAAA	1237		
Query 120	AGGAGTTTGATCCATCGGATGAAAAATGAAAGTAAATCGATGTTTCATAAGTATTACCACAA	179		
Sbjct 1238	AGGTGTTTGATGCATCGGATGAAAAATGTTAGTAAATCGATGTTAATAAGTATTACCACAA	1297		
Query 180	TAATTGGTGGAGCCATTTTTGTT	202		
Sbjct 1298	TAATTGGTGGAGCCATTTTTGTT	1320		

[Download](#) ▼ [GenBank](#) [Graphics](#) ▼

Canine herpesvirus DNA for ORF 1 (HSV1 UL44, EHV1 ORF 15 homolog)  
 Sequence ID: [emb|X90446.1](#) Length: 2260 Number of Matches: 1

Range 1: 1191 to 1393 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
313 bits(169)	4e-82	192/203(95%)	1/203(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACCACCCTGGTTTGGTCAATATTCATAATAATATAGATATTTCCGATTATCATGAACCTG	60		
Sbjct 1191	ACCACCCTGGTTTGGTCAATATTCAAAAATAAAATAGATATATCGGATTATGATGAACCTG	1250		
Query 61	TTACCTAT-AATGTTCAATTATTGGTTATCCAATAATTTTTCCCAACTTTTATGATGAAA	119		
Sbjct 1251	TTACCTATAAATGTTCAATTATTGGTTATCCAATAATTTTTCCCAACTTTTATGATGAAA	1310		
Query 120	AGGAGTTTGATCCATCGGATGAAAAATGAAAGTAAATCGATGTTTCATAAGTATTACCACAA	179		
Sbjct 1311	AGGTGTTTGATGCATCGGATGAAAAATGTTAGTAAATCGATGTTAATAAGTATTACCACAA	1370		
Query 180	TAATTGGTGGAGCCATTTTTGTT	202		
Sbjct 1371	TAATTGGTGGAGCCATTTTTGTT	1393		