



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Medicina Veterinaria y**

**Zootecnia**

**ANÁLISIS DE UN AISLAMIENTO POR PCR Y DETERMINACIÓN  
DE ANTICUERPOS POR ELISA DE HERPESVIRUS EN CABRAS  
DE LA REPÚBLICA MEXICANA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

**MONTSERRAT ELEMI GARCÍA HERNÁNDEZ**

ASESORES:

LAURA COBOS MARÍN  
ROSA ELENA SARMIENTO SILVA

México, D.F.

Septiembre, 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ABREVIATURAS

ADN. Ácido Desoxirribonucleico

CpHV-1. *Herpesvirus caprino* tipo 1

CCDA. Célula Presentadora de Antígeno

BoHV-1. *Herpesvirus bovino* tipo 1

BoHV-5. *Herpesvirus bovino* tipo 5

CvHV-1. *Herpesvirus cérvido* tipo 1

CvHV-2. *Herpesvirus cérvido* tipo 2

CTL. Linfocito Citotóxico

DO. Densidad Óptica

RanHV-1. *Herpesvirus de alce* tipo 1

IBR. Rinotraqueítis Infecciosa Bovina

IF. Inmunofluorescencia

PI. Pos infección

IHQ. Inmunohistoquímica

CIIN. Cuerpos de Inclusión Intranucleares

ELISA. Ensayo Inmuno Enzimático

EP. Embrión de Pollo

FRW. Forward

MCA. Membrana Corioalantoidea

MDBK. Madin Darby Bovine Kindey

MEM. Medio Esencial Mínimo

MHC. Complejo de Histocompatibilidad

Mab's. Anticuerpos Monoclonales

NK. Natural Killer

ORF. Open Reading Frame

gC. Glicoproteína C

gB. Glicoproteína B

gD. Glicoproteína D

gE. Glicoproteína E

gH. Glicoproteína H

gK. Glicoproteína K

gL. Glicoproteína L

HS. Heparan Sulfato

HRPO. Peroxidasa de rábano picante

PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa

LAT. Transcrito asociado a la Latencia

RVS. Reverse

SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera

TAP. Transportador asociado al procesamiento de antígeno

TMB. Tetrametilbencidina

**CONTENIDO**

ABREVIATURAS.....	II
RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
ESTRUCTURA .....	3
RELACIÓN CON OTROS ALFAHERPESVIRUS.....	6
PATOGENIA.....	7
CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL .....	9
LATENCIA Y REACTIVACIÓN.....	12
RESPUESTA INMUNE Y EVASIÓN .....	14
SIGNOLOGÍA .....	19
DIAGNÓSTICO.....	21
EPIZOOTIOLOGÍA .....	22
ANTECEDENTES.....	23
JUSTIFICACIÓN.....	25
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVO PARTICULAR .....	26
MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
I. ANÁLISIS MOLECULAR.....	27
II. ANÁLISIS SEROLÓGICO.....	31
RESULTADOS .....	35
I. ANÁLISIS MOLECULAR.....	35
II. ANÁLISIS SEROLÓGICO.....	38
DISCUSIÓN .....	40
CONCLUSIONES.....	46
ANEXOS .....	47
LITERATURA CITADA.....	48

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA), por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A los laboratorios de Serología y Mycoplasma del Departamento de Microbiología, especialmente a la Dra. Grisel Anaya y a la Dra. Rosa Elena Miranda por la donación de sueros usados para este trabajo.

Por otro lado quisiera reconocer la importante labor de los miembros del jurado por sus valiosos comentarios que me ayudaron a mejorar el escrito.

Quisiera agradecer a la Dra. Laura Patricia Noé, por despertar mi interés en la virología, motivarme a acercarme al laboratorio, y, por su apoyo y orientación a lo largo de esta etapa.

A la MVZ. Esp. Liliana M. Valdés Vázquez por ser siempre tan amable conmigo, siempre con una grata sonrisa, una enorme paciencia y disponibilidad.

Un agradecimiento al Dr. Gilberto Vauhgan, por su ayuda con el diseño de los iniciadores y la purificación del amplificado, pero sobretodo por su disposición a ayudarme a lo largo de este proyecto.

A todos los integrantes y compañeros del laboratorio de Virología les agradezco haberme permitido conocerlos a lo largo de todo este tiempo, por sus consejos, sus anécdotas, pero sobretodo por su valiosa amistad.

Debo agradecer de manera especial a mis asesoras, la Dra. Laura Cobos Marín por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección, por sus aportaciones, revisiones, orientación y ayuda en la elaboración de este trabajo, y a la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva por darme parte de su tiempo para resolver mis dudas, darme su asesoría, paciencia, apoyo y, sobretodo, sus sabios consejos.

Este trabajo forma parte del Proyecto PAPIIT IN228511-3 "AISLAMIENTO, TIPIFICACIÓN MOLECULAR Y DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE HERPES VIRUS CAPRINO TIPO 1, EN MÉXICO" financiado por la Dirección General de Apoyos al Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

## RESUMEN

**GARCÍA HERNÁNDEZ MONTSERRAT ELEMI. ANÁLISIS DE UN AISLAMIENTO POR PCR Y DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS POR ELISA DE HERPESVIRUS EN CABRAS DE LA REPÚBLICA MEXICANA (BAJO LA DIRECCIÓN DE: DRA. LAURA COBOS MARÍN Y DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA)**

La infección por *Herpesvirus caprino* tipo 1 (CpHV-1 por sus siglas en inglés), tiene una distribución mundial mayor al 50%, con una elevada seroprevalencia. En México no se han realizado estudios serológicos referentes a la infección. Sin embargo, en noviembre de 2008 se registró un brote sospechoso a CpHV-1 en un hato de 244 cabras ubicado en el municipio de Tequisquiapan, Querétaro, A partir de este brote, en el laboratorio de virología de la FMVZ UNAM, se hizo el aislamiento sugerente a CpHV-1 que fue identificado por medio de anticuerpos monoclonales contra la glicoproteína C de CpHV-1. El objetivo del presente trabajo fue identificar este aislamiento molecularmente por medio de la amplificación de una región correspondiente a la glicoproteína B del CpHV-1 mediante la técnica de PCR así como su secuenciación y realizar un estudio serológico, mediante la prueba ELISA de bloqueo de anticuerpos contra la glicoproteína B de herpesvirus en cabras de distintos estados de la República Mexicana.

En este trabajo no se logró confirmar la presencia de CpHV-1 en México; se obtuvo, mediante la secuenciación del aislado del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en el Altiplano, una secuencia similar al CpHV-1. Se detectaron anticuerpos contra la glicoproteína B de herpesvirus en los estados Guanajuato, Querétaro, Puebla, Nuevo León, Morelos y Distrito Federal.

## INTRODUCCIÓN

En México, la mayoría de las unidades productivas de cabras se conforman de pequeños rebaños manejados directamente por un pastor o una familia, que realiza todas las actividades de manejo. En los últimos años, en la Comarca Lagunera y El Bajío, la caprinocultura se ha ido transformado en una actividad más tecnificada y económicamente productiva. La mayor parte se destina a la preparación de quesos y dulces.

El Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en el 2011 publicó un aproximado a 9,004,377 cabras en el territorio nacional; los estados con mayor número de cabezas fueron: Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Zacatecas, Guerrero, Guanajuato y Coahuila. Las principales regiones en producción de leche de cabra fueron: la norte (66.78%) y centro (28.77%), siendo los estados más productivos Coahuila, Durango, Guanajuato, Chihuahua, Jalisco y Nuevo León (SIAP,2008).

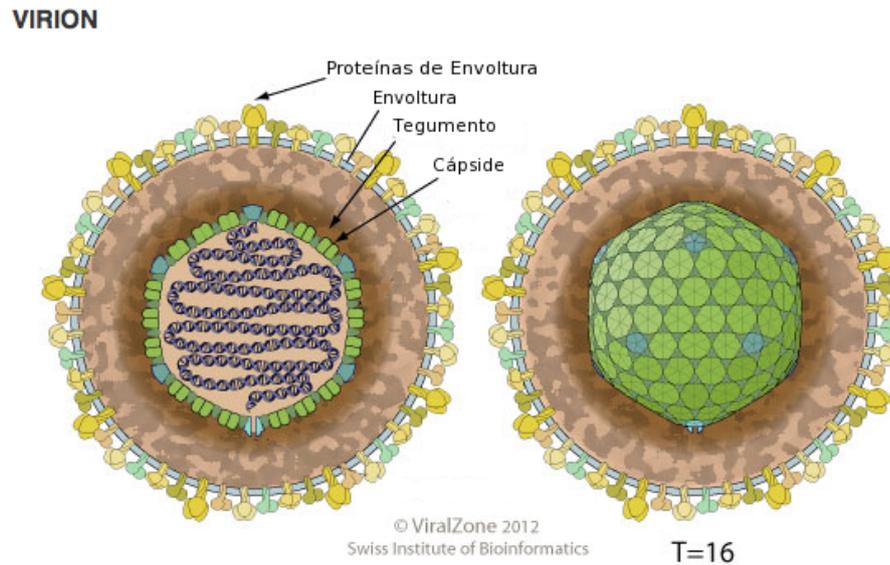
Las patologías asociadas con problemas reproductivos, como las producidas por herpesvirus, generan importantes pérdidas económicas para la producción. Los virus pertenecientes a la familia *Herpesviridae* están ampliamente distribuidos en la naturaleza y afectan a una gran cantidad de especies animales. Esta familia esta compuesta por virus con ADN, los cuales están clasificados dentro de 3 subfamilias: *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*<sup>1</sup>.

Uno de los principales Herpesvirus que afectan a la producción de cabras es el Herpesvirus Caprino tipo 1 (CpHV-1), que está clasificado dentro de la subfamilia *Alfaherpesvirinae* género *Varicellovirus*. Infecta células epiteliales *in vivo* e *in vitro*, en las que produce una infección citolítica de corta duración; establece una infección latente en el ganglio sacro, el cual pertenece a los ganglios paravertebrales del sistema nervioso simpático. El estado de latencia se mantiene durante toda vida del animal y puede ser reactivado bajo condiciones de estrés. El virus provoca abortos, muerte neonatal, vulvovaginitis y balanopostitis en adultos, así como enfermedad sistémica en cabritos.<sup>2</sup>

Se ha demostrado que otras especies de rumiantes son susceptibles al CpHV1 en infecciones experimentales. Éste logra la infección con éxito en el ternero y en el cordero, con excreción viral y seroconversión.<sup>3</sup>

## **ESTRUCTURA**

La arquitectura del virión es probablemente el rasgo más característico de la familia *Herpesviridae*, su diámetro es de 120 a 300 nm.<sup>1,2</sup> La síntesis de ADN viral y el ensamblado de la cápside ocurren en el núcleo celular. Un virión de herpesvirus presenta cuatro estructuras morfológicas bien diferenciadas<sup>1,4</sup>, las cuales se representan en la Figura 1:



**Figura 1.** Estructura de Herpesvirus disponible desde [[http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/179.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/179.html)]<sup>2</sup>

- **Core:** compuesto por ADN lineal de doble cadena <sup>1</sup> Está formado por un segmento denominado único largo (UL) y un segmento único corto (US) flanqueado por dos zonas de secuencias repetidas e invertidas interna (Ir) y terminal (Tr).

Aproximadamente 26 genes son conservados entre las tres subfamilias de Herpesvirus, estos se denominan genes “core”, cada uno corresponde a 1 de 7 bloques de genes conservados (bloque I al VII), y dentro de cada bloque, mantienen un orden y una orientación transcripcional. Éstos genes presentan un orden y una orientación diferente en cada una de las subfamilias que componen la familia *Herpesviridae*.<sup>4,5,6,7</sup>

- **Cápside:** de simetría icosaédrica conformada por 150 hexámeros y 12 pentámeros que protegen el core. Su ensamblaje se lleva a cabo en el núcleo de la célula infectada, donde también tiene

lugar el empaquetamiento de la molécula de ADN.<sup>5,8,9,10</sup> La estructura formada por la cápside y el genoma recibe el nombre de nucleocápside.

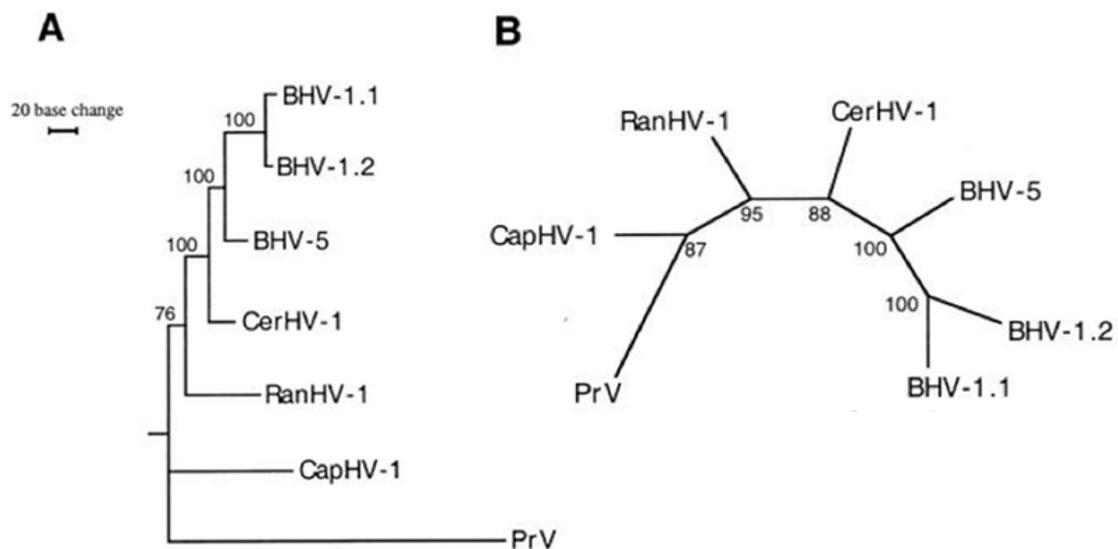
- **Tegumento:** es característico de los Herpesvirus; está formado por más de 15 proteínas que cubren a la cápside. El tegumento aporta una serie de factores o proteínas al citosol de la célula infectada, para facilitar el inicio y desarrollo del ciclo de infección: participa en el transporte de la cápside a través de la célula, interviene en la entrada del ADN viral al núcleo y participa en la salida del virión de la célula huésped.<sup>4,8</sup>

- **Envoltura:** la partícula vírica está rodeada por una bicapa lipídica que contiene un gran número de glicoproteínas, entre las cuales la glicoproteína B (gB), la glicoproteína C (gC), y la glicoproteína D (gD) son las más abundantes<sup>4,8,11,12</sup>. Estas proteínas constituyen un elemento fundamental de la envoltura, pues desempeñan funciones básicas de interacción entre el virus y el organismo hospedador. Las glicoproteínas son necesarias para el reconocimiento, unión, penetración, salida y transmisión célula-célula del virión en células susceptibles a la infección.<sup>5</sup>

Las glicoproteínas B, D, H, L y K están codificadas por genes esenciales, y son por lo tanto proteínas fundamentales en todos los herpesvirus. Por el contrario, las glicoproteínas C, E, G, I, J, M y N son no esenciales y participan en la unión de los herpesvirus con la célula diana, en la modulación de la respuesta inmunitaria del hospedador, en la morfogénesis de los viriones y en la señalización de la ruta celular de transmisión de la infección.<sup>4,5</sup>

## RELACIÓN CON OTROS ALFAHERPESVIRUS

Los análisis filogenéticos de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la glicoproteína B (gB) y la glicoproteína D (gD), (ver Figura 2) revelan que el CpHV-1 es el más distante entre los alfa herpesvirus de rumiantes, como son: el virus del Herpes bovino tipo 1 (BoHV-1), el Herpesvirus bovino tipo 5 (BoHV-5), el Herpesvirus caprino tipo 1 (CpHV-1), los Herpesvirus de cérvidos 1 y 2 (CvHV-1, CvHV-2) y un Herpesvirus en alces (RanHV-1)<sup>6, 7, 8</sup>



**Figura 2.** Árbol filogenético de la gB (A) y gD (B) de los 5 *alfaherpesvirus* de rumiantes, Ros, Belak 1999.<sup>7</sup>

Con base en la secuencia completa de la gB, la más conservada entre los herpesvirus<sup>9</sup>, el porcentaje de identidad entre el CpHV-1 con respecto al BoHV-1 es del 78.5%.<sup>6</sup> En la gD la homología entre estos dos virus es del 68.8%<sup>10</sup> y finalmente en la glicoproteína C (gC) es del 55.6% (Figura 2)<sup>7, 11</sup>.

Debido a esta relación, el BoHV-1, se ha considerado como virus de referencia para el estudio del CpHV-1, ya que el ciclo de replicación, latencia y

patogénesis en cabras infectadas es muy similar a la producida por el BoHV-1 en el ganado bovino.<sup>12,13</sup>

La recombinación homóloga es un mecanismo frecuente entre herpesvirus<sup>14</sup>. Ésta favorece la biodiversidad genética de los alfa herpesvirus, aunque este rol haya sido desestimado hasta hace poco, por la falta de métodos eficaces para el estudio de recombinantes. La recombinación también actúa para crear diversidad de cepas de herpesvirus y puede considerarse como una herramienta para aumentar la virulencia. Estudios *in vitro* revelaron que la recombinación entre dos virus que pertenecen a la misma especie de alfa herpesvirus es un fenómeno frecuente en co-infecciones experimentales.<sup>15,16</sup>

## **PATOGENIA**

La vía de entrada del CpHV-1 puede ser tanto nasal como genital. Debido a que las partículas víricas son sensibles al calor, luz solar, ultravioleta y a la desecación, así como al éter, alcohol, hipoclorito de sodio y acetona, no tienen buena permanencia fuera del organismo infectado, por lo que su transmisión requiere un contacto directo.<sup>17</sup>

Cuando la vía de entrada es genital la replicación viral está limitada a esta mucosa. En inoculaciones vaginales el virus sólo es detectado en hisopados vaginales en los días 5 -7 PI (post-inoculación), presentando eritema, edema, vesículas a úlceras en vulva y vagina lo cual sugiere que la infección genital se

establece sin provocar viremia.<sup>18, 20</sup>

Por el contrario, si la vía de entrada es la nasal, se produce una lesión epitelial en la cavidad nasal, seguida por una viremia asociada a células mononucleares, que puede llevar a una infección sistémica y, en hembras gestantes, abortos. La viremia asociada con la inoculación intranasal ha sido demostrada experimentalmente mediante la recuperación del virus o su detección por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en fetos abortados<sup>18,19</sup> El virus finalmente alcanza el tracto genital, con la aparición de las lesiones características: vulvovaginitis ulcerativa y balanopostitis ulcerativa.<sup>20</sup>

Los abortos ocurren durante la segunda mitad de la gestación y han sido provocados experimentalmente con inoculaciones intranasales e intravenosas; el ADN viral ha sido identificado en placenta y diferentes órganos del feto abortado. El virus produce necrosis tisular y cuerpos de inclusión en múltiples órganos como: hígado, cerebro, pulmones y riñón<sup>20,21,22, 23, 24.</sup>

En otros estudios con inoculaciones intranasales, las cabras comenzaron a presentar fiebre (39.9-40.4° C) a partir del día 4 postinoculación (PI) la cual duró 7 días. Durante este periodo los animales también presentaron leucopenia y finalmente lesiones ulcerativas en vulva en el 7 día PI. En este mismo estudio se recuperó el virus a partir de hisopados nasales en los días 5-9 PI y entre los días 6-9 PI en los hisopados vaginales.<sup>12,26, 25</sup>

En cabritos, el CpHV-1 provoca una enfermedad sistémica caracterizada por una alta morbilidad. Se encuentran lesiones necróticas distribuidas a lo largo del tracto entérico.<sup>26,27</sup>

## **CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL**

La infección con CpHV-1 en líneas celulares permisivas, células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK), conduce primordialmente a una rápida muerte celular ocasionada por la inducción de un estado apoptótico por la activación de diferentes caspasas celulares.<sup>28,29</sup> Este proceso inicia con la fusión de la envoltura del virus con la membrana plasmática celular, la cual es dependiente de la unión de glicoproteínas virales presentes en la envoltura del virus con los receptores en la membrana celular.<sup>30</sup> Aunque la totalidad de estas moléculas no están completamente dilucidadas, está claramente establecida la unión a heparán sulfato (HS) en la membrana celular con las glicoproteínas virales gB y gC.<sup>31</sup> Después de la unión inicial, las gB y gD se unen con alta afinidad a sus receptores en la membrana celular.<sup>32</sup>

Diversos estudios han demostrado que las diferentes glicoproteínas virales (gB, gC, gD, gE, gH, gK y gL) son requeridas en el proceso de entrada del virus a la célula.<sup>33</sup>

Distintos autores han propuesto un modelo de unión bifásica del virus a la célula según el cual la gC no sólo une el virus al HS de la superficie celular, sino que induce la formación de un complejo estable de los receptores para promover la interacción de otra glicoproteína: la gD, con un receptor

secundario.<sup>34</sup> Tras la unión de gC y gD se da la fusión entre la envoltura vírica y la membrana celular con la participación de gB y gH.

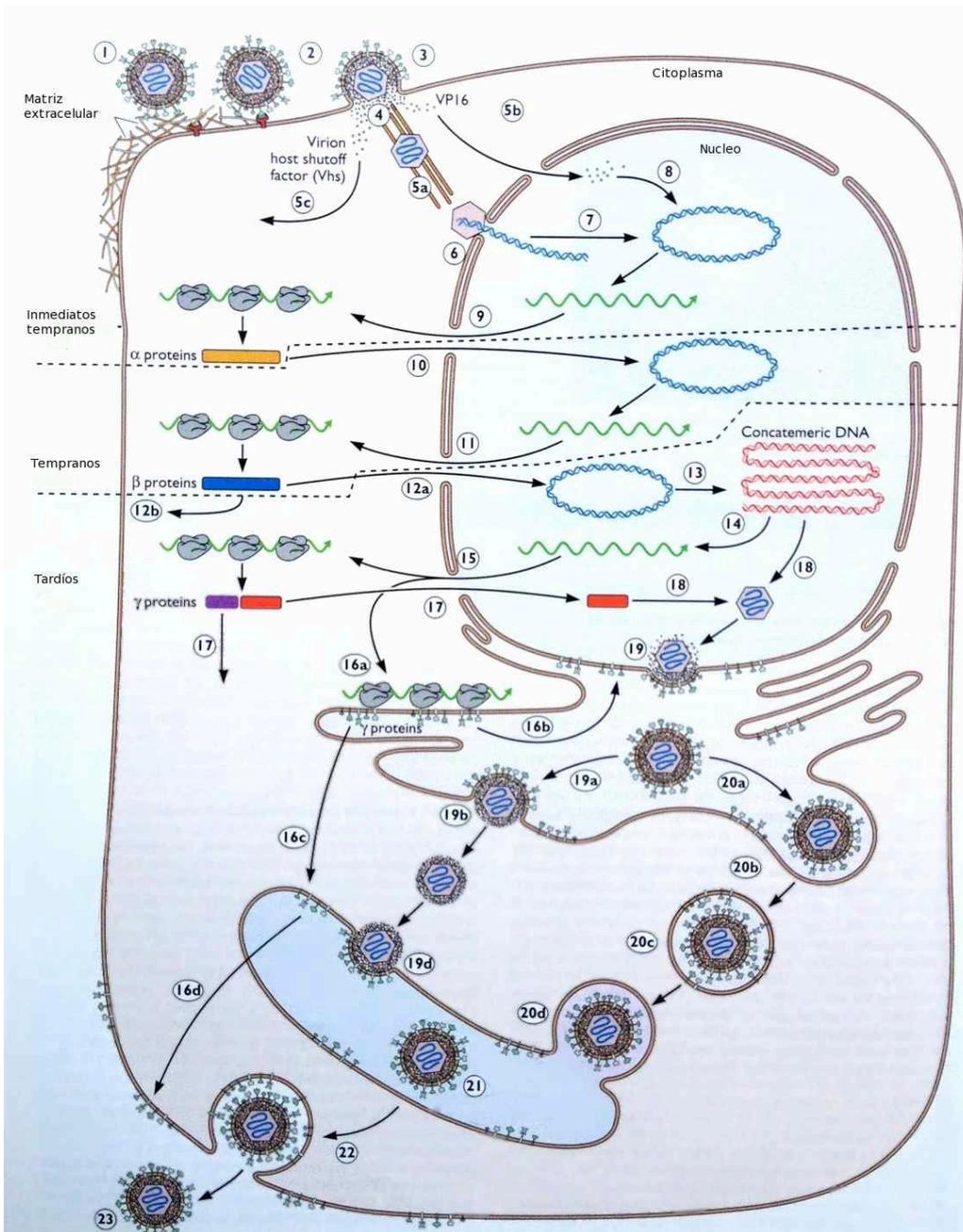
Después de la liberación de la nucleocápside en el citoplasma, el CpHV-1 es transportado hasta el núcleo a través de los microtúbulos hasta el núcleo; donde luego de la internalización del genoma en el núcleo celular, se replica usando proteínas virales y celulares. Dependiendo del momento en que los genes virales son expresados durante la replicación son clasificados en tres clases: inmediatos tempranos, tempranos y tardíos.<sup>35</sup>

Los genes inmediatos tempranos tienen una función regulatoria que activan a otros genes virales. Los genes tempranos, participan en la síntesis del ADN viral, finalmente los genes tardíos codifican para proteínas estructurales del virus.<sup>35</sup>

Después del ensamblaje, la nucleocápside deja el núcleo por gemación en la cara interna de la membrana nuclear y fusión con la membrana nuclear externa, el virus adquiere su envoltura secundaria y tegumento en el aparato de Golgi. Posteriormente son transportados dentro de vesículas intracelulares (trans-Golgi) a la membrana citoplasmática para su posterior liberación de la célula<sup>36</sup> finalmente abandonan la célula hospedera por exocitosis mediada por vesículas (ver fig. 3).

La replicación del genoma comienza dentro de las dos horas siguientes a la infección inicial del animal,<sup>37</sup> con la expresión de antígenos en la superficie

celular entre las tres a cuatro horas siguientes a la infección, la liberación de partículas virales y dispersión a las ocho horas posinfección.<sup>8,38,</sup>



**Figura 3.** Ciclo de Replicación viral: Ciclo de replicación del BoHV-1. Adhesión de los viriones a la membrana celular (1); fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática (2); liberación de la nucleocápside en el citoplasma (3,4); transporte de la nucleocápside hacia el núcleo e interacción con la membrana nuclear (5); internalización del genoma en el núcleo celular (6); transcripción del ADN (7); replicación secuencial del genoma viral (8); transporte del RNA viral al citoplasma para ser traducido (9); generación de proteínas inmediatas tempranas (9), tempranas (10,11) y (12) tardías. (13,14,15) replicación de ADN viral (16,17) las proteínas estructurales son redirigidas al núcleo para la encapsidación (18). Las proteínas de la

envoltura son transportadas al retículo endoplasmático (19, 20), son incorporadas en diferentes membranas celulares y direccionadas a través de la vía secretoria (19b). La nucleocápside deja el núcleo por gemación en la cara interna de la membrana nuclear (20b) y fusión con la membrana nuclear externa (20b), el virus adquiere su envoltura secundaria en el aparato de golgi (21); y finalmente abandona la célula hospedera por exocitosis mediada por vesículas (22,23). Tomado de Flint SJ, Enquist LW, Krug RM. Principles of virology, Molecular Biology, pathogenesis, and control. ASM Press, Washinton D.C., 2000<sup>43</sup>

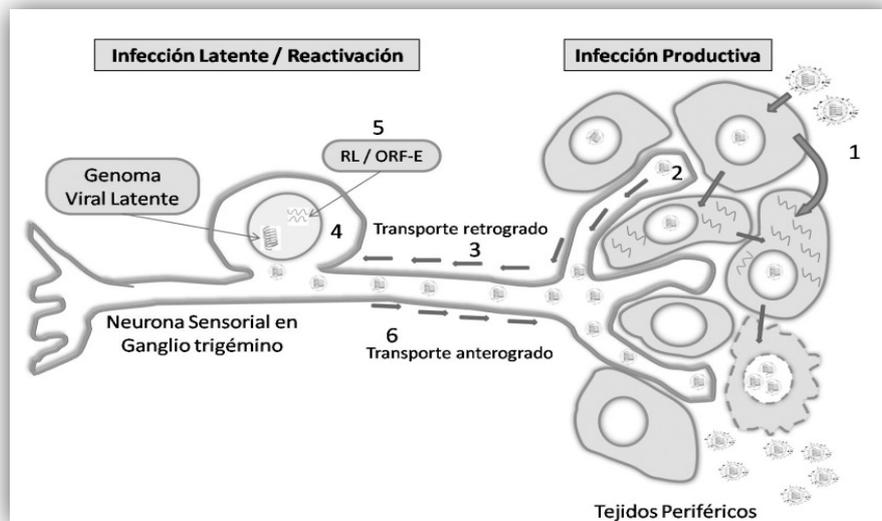
La infección latente ocurre en neuronas sensoriales, una vez en el núcleo, la transcripción es restringida, un grupo de RNAs específicos llamados los Transcritos Asociados a la Latencia (LATs) son los únicos productos virales sintetizados en grandes cantidades, la transcripción de genes inmediatos-tempranos y tempranos puede ocurrir pero no es suficiente para iniciar una infección productiva. Al haber modificaciones en la fisiología neuronal inducidos por trauma, cambios hormonales y situaciones de estrés, la infección productiva puede reactivarse.<sup>39,40</sup>

## **LATENCIA Y REACTIVACIÓN**

La latencia permite que el virus permanezca en un hospedador infectado durante largos periodos de tiempo. Es un periodo durante el cual no es posible detectar virus infecciosos mediante los procedimientos estándar de aislamiento viral, y en general tampoco hay expresión de los genes virales necesarios para el establecimiento de una infección productiva.

Los miembros de la subfamilia *Alfaherpesvirinae*, establecen latencia durante toda la vida del hospedero en neuronas ganglionares del sistema nervioso periférico.

Después de la replicación inicial en el epitelio mucoso, la nucleocápside del virus es direccionada por transporte axonal retrógrado (Ver fig. 4) hasta el cuerpo de la neurona sensorial dentro del ganglio sacro, allí el ADN es insertado en el núcleo de la neurona, entrando en un estado de transcripción restringida, el cual le permite evadir la respuesta inmune del hospedero.<sup>41</sup>.



**Figura 4.** Modelo de transporte axonal del BoHV-1. Luego de la infección primaria (1) el virus invade las terminaciones sensoriales de las neuronas (2), a través de las cuales las nucleocápsides ascienden por transporte axonal retrógrado (3) al cuerpo celular neuronal dentro del ganglio (4), en el cual establece su latencia y solo se expresa RL y ORF-E (5). Durante episodios de estrés o inmunosupresión, el virus es reactivado y transportado de manera anterógrada (6) hasta el sitio inicial de la infección, donde puede producir gran cantidad de partículas virales.<sup>4</sup>

El establecimiento del estado de latencia involucra la entrada de la cápside viral en una neurona sensorial, el posterior acceso del genoma al núcleo y la infección aguda; después, la expresión de genes virales se suspende o se disminuye drásticamente.

En estudios hechos sobre BoHV-1 se demuestra que la expresión de dos transcritos virales: uno relacionado con latencia (RL) y el ORF-E, que se

expresan en forma abundante expresados en ganglios durante la latencia<sup>42</sup> están involucrados en la regulación del complejo ciclo de latencia y reactivación de la infección. Estos Transcritos Asociados a la Latencia (LATs) son los únicos productos virales sintetizados en grandes cantidades, y tienen un papel anti- apoptótico. Otro modelo sugiere que también tienen un papel en la regulación de la expresión de otros genes virales durante la latencia.<sup>43, 44</sup>

La evidencia en estudios con BoHV-1 demuestra que la expresión abundante de RL en neuronas sensoriales potencialmente inhibe la proteína inmediata-temprana bICP0 la cual activa promotores virales, y de esta forma, bloquea la infección productiva, promoviendo el establecimiento y mantenimiento de la latencia.<sup>41</sup>

Periódicamente, el virus es reactivado durante eventos de estrés, inmunosupresión o uso prolongado de corticoides, lo que produce partículas virales, que migran en forma centrífuga usando el transporte axonal anterógrado de la misma neurona por la cual ascendieron, alcanzando el sitio inicial de replicación. Posteriormente es excretado en secreciones a través de las cuales puede infectar a otros animales susceptibles.<sup>41,42,43</sup>

En casos de reactivación con corticosteroides, el virus se aísla sobre todo de hisopados vaginales y ha sido detectado por PCR en el tercer y cuarto ganglio sacro.<sup>45,46</sup>

## **RESPUESTA INMUNE Y EVASIÓN**

La sobrevivencia del virus en cada paso de su ciclo de infección depende en gran parte de la capacidad de evasión a la respuesta inmune del hospedero. En virus, la respuesta innata está compuesta principalmente por el interferón (INF), que induce un estado antiviral en células infectadas y las células NK (natural killer cells) que son linfocitos citolíticos que reconocen y destruyen las células infectadas por virus. Otros componentes importantes son el complemento, los macrófagos y neutrófilos.<sup>47</sup>

Al infectarse las células con un virus, una forma de respuesta es la liberación de citocinas, que son proteínas regulatorias para la comunicación intercelular y que son producidas por células bajo condiciones apropiadas y funcionan localmente o provocando respuestas globales como: inflamación, inducción de estado antiviral en células vecinas y regulación de la respuesta adaptativa.<sup>47</sup>

Entre las citocinas más importantes están los interferones, que pueden ser liberados por monocitos, macrófagos, células epiteliales y fibroblastos, los cuales tienen varias funciones: inhibición de la replicación viral, bloqueo de transcripción o traducción, inhibición del crecimiento celular de células normales y malignas, acción estimulante sobre fagocitosis, acción moduladora de la respuesta inmune, de tal forma que el interferón limita o circunscribe la infección viral. Algunos herpesvirus como Epstein Barr (EBV) pueden expresar sus propias citocinas como un homólogo de interleucina 10 (IL-10) que tiene un actividad inmunosupresora. También se lleva a cabo el bloqueo de la activación del factor de transcripción IRF7, lo que impide la expresión del interferón tipo 1.

Los linfocitos NK son activados con el reconocimiento de la célula dañada y liberan perforinas y granzimas que inducen apoptosis en las células infectadas con virus. Además, pueden secretar citocinas como interterferón gamma y factor de necrosis tumoral, que interfieren con la replicación viral. Los ligandos de los receptores de las células NK son blancos para la evasión viral: algunos herpesvirus como el citomegalovirus disminuyen la expresión de ligandos activadores de células NK como el NKG2D mediante una proteína viral llamada UL16 que puede unirse a este receptor lo que resulta en la retención y secuestro de este ligando.<sup>48</sup>

El sistema de complemento, participa en el ataque directo a virus envueltos ya que lisa la mayor parte de éstos y da lugar a la fragmentación de la envoltura y desintegración de la nucleocápside. También puede participar en la lisis de la células infectadas.<sup>49</sup>

Algunos herpesvirus como el Epstein Barr pueden activar las vías alterna y de las lectinas del complemento generando cierto grado de neutralización por la formación de agregados virales más grandes. Los depósitos de anticuerpo y complemento en partículas virales facilitan la unión del virus a células que poseen Fc o receptores de complemento tipo 1, en caso de las células fagocíticas, esta unión puede ir seguida de fagocitosis y destrucción de la partícula viral.<sup>53</sup>

Según estudios con Herpesvirus simplex (HSV) la gC es una de las moléculas de evasión del sistema de complemento mejor caracterizadas. Ésta se une al factor C3 y sus productos de activación C3b, iC3b y C3c, e inhibe la acción de la C3 convertasa que da lugar a estos productos. También inhibe la unión de C3b a los factores del complemento: properdina y C5.<sup>50,51</sup> Con esto la gC protege al virus del ataque del complemento tanto al inhibir su activación, como al impedir la lisis de las células infectadas mediada por complemento.<sup>52,53</sup>

Probablemente el mecanismo más relevante para el éxito de la infección viral sea la evasión de la respuesta inmune específica, a través de la disminución de la expresión de moléculas de histocompatibilidad (MHC) en las células. Una de las principales funciones de estas moléculas es la presentación local de antígenos para la activación de los linfocitos T a través de la interacción con las células presentadoras de antígenos como las células dendríticas, importantes en muchas infecciones virales. Estas células expresan niveles altos de (MHC) y coestimulan a los linfocitos T.<sup>56,55</sup>

Los linfocitos T expresan un receptor de antígeno de superficie TCR gracias al cual pueden reconocer antígenos virales mostrados tanto por la célula presentadora de antígeno, como por la célula infectada. En el caso particular de los linfocitos TCD4 el resultado de su activación es la cooperación con los linfocitos B para producir los diferentes tipos de anticuerpos antivirales que actúan en forma específica en la neutralización viral y para que algunos de los linfocitos B se diferencien en células de memoria que rápidamente proliferan y secretan inmunoglobulinas ante una reinfección.<sup>54,56,51</sup>

Además de lo anterior, los linfocitos T CD4 son reguladores inmunológicos, reúnen a las células de la respuesta inmune en el sitio de infección e incrementan el número de linfocitos T CD8. También son capaces de tener una actividad contra los virus ya que pueden liberar citocinas como el interferón gamma.<sup>54</sup>

Los linfocitos CD8 (CTLs) participan en la lisis de las células infectadas con virus, liberan sustancias con actividad antiviral y reconocen cualquier tipo de célula susceptible a la infección viral; liberan interferón gamma. Reconocen péptidos virales en las moléculas de histocompatibilidad clase I (MHC I) en la superficie celular de células infectadas y las destruyen a través de perforinas y granzimas.<sup>54</sup>

Los herpesvirus codifican proteínas que inhiben la presentación de antígenos en MHC I y MHC II por diferentes vías como: la dislocación de la cadena pesada de MCH I hacia el citosol, la endocitosis de MHC I, al codificar homólogos virales de interleucina 10 (la cual tiene como función la disminución de la expresión de MCH II), e inhibiendo el tráfico de la molécula a través de la célula. La alteración de la síntesis de proteínas de la célula infectada, una vez que comienza el ciclo lítico es una característica de los alfa herpesvirus, que les permite evadir la detección por MHC I y II.<sup>54, 55</sup>

En el caso particular del BoHV-1 éste reduce el transporte de péptidos gracias a la acción de la proteína UL49.5, que además de arrestar al complejo TAP

(Transportador asociado al procesamiento de antígeno) induce la degradación de sus subunidades; lo cual evita el transporte de péptido a la MHCI y su expresión en la superficie. Lo anterior evade la detección por los CTL.<sup>56</sup>

La respuesta inmune humoral primero se presenta con inmunoglobulinas M, predominantes de la respuesta primaria que son muy eficaces en la activación de la vía clásica del complemento. Mas tarde en la respuesta predominan las inmunoglobulinas G que tiene una mayor afinidad al antígeno y pueden neutralizar a los virus y favorecer la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) al facilitar la acción de los linfocitos NK. En el caso de las superficies mucosas la IgA secretora permite la neutralización viral.<sup>47,54</sup>

## **SIGNOLOGÍA**

En hembras adultas:

Dependiendo del estado inmunológico y nutricional de los animales el CpHV-1 es el agente causal de vulvovaginitis<sup>57, 58</sup> de moderada a severa. Cuando la vía de entrada es intranasal puede producir abortos a partir del segundo tercio de la gestación<sup>21</sup> muerte embrionaria o muerte neonatal.<sup>58,24,59</sup>

En las hembras, los signos clínicos de vulvovaginitis se presentan dentro de los primeros 11 días después de la introducción de los sementales infectados subclínicamente (Figura 5).



**Figura 5.** Lesiones características de Herpesvirus presentes en cabras muestreadas para el estudio en el municipio de Tequisquiapan, Querétaro. Tomadas en Marzo de 2013

En neonatos:

Se presenta debilidad progresiva, fiebre, dolor abdominal, cianosis y ritmo cardiaco acelerado. Se manifiesta un cuadro sistémico que incluye lesiones ulcerativas y necróticas en la mucosa del tracto gastrointestinal, edema pulmonar, hemorragias en la mucosa de la vejiga urinaria. Las células hepáticas se muestran hinchadas y vacuoladas, con presencia de cuerpos de inclusión intranucleares. <sup>21, 58, 60, 61, 62</sup>

En machos adultos:

En etapas más avanzadas de la infección el virus provoca balanopostitis pustular infecciosa de moderada a grave con lesiones prepuciales pustulares y ulcerativas multifocales (Figuras 6 y 7) en machos.<sup>18</sup> Las biopsias prepuciales muestran necrosis del epitelio. <sup>20,24,30</sup>



**Figura 6.** Lesiones en prepucio en un animal del estudio en el municipio de Tequisquiapan, Querétaro. Tomada en Marzo de 2013.



**Figura 7.** Lesiones en prepucio en un animal del estudio en el municipio de Tequisquiapan, Querétaro. Tomada en Marzo de 2013.

## DIAGNÓSTICO

El diagnóstico del CpHV-1 se realiza principalmente a partir de 4 pruebas: Inmuno Ensayo Enzimático (ELISA), seroneutralización (SN), Inmunofluorescencia indirecta (IF), y, una molecular: reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las pruebas serológicas detectan la presencia de anticuerpos, mientras que la PCR puede identificar el genoma viral directamente de muestras sospechosas.

- Inmuno Ensayo Enzimático (ELISA). No hay anticuerpos comerciales para realizar el diagnóstico de CpHV-1 por medio de esta prueba. Sin embargo, debido a que existe una reacción cruzada con el herpes virus bovino, se han utilizado pruebas comerciales de ELISA para diagnóstico de IBR como: BoHV-1 gB ELISA de bloqueo (SERELISA IBR/IPV gB Ab Mono Blocking, Synbiotics Europe, Lyon, France) y BoHV-1 gE ELISA de bloqueo (Herdchek Anti-IBR gE, Idexx, Germany).<sup>59, 66, 67</sup>

- Seroneutralización (SN). Esta prueba se realiza en cultivo celular empleando células de riñón bovino de la línea Madin-Darby (MDBK) infectadas con 75 UFP (unidades formadoras de placa) de la cepa BA-1 de CpHV-1.<sup>63,64</sup>

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR ) y PCR en tiempo real. Estas pruebas se realizan de forma directa a partir de hisopos nasales/vaginales, de muestras de tejido y células MDBK infectadas. Los iniciadores que se han empleado amplifican una región conservada del gen gC (glicoproteína C).<sup>65</sup>

- Inmunofluorescencia Indirecta. Se emplean anticuerpos monoclonales murinos (Mabs) específicos contra la gC del CpHV-1: Esta prueba permite distinguir entre los diferentes herpesvirus de rumiantes.<sup>7,8</sup>

## **EPIZOOTIOLOGÍA**

El CpHV-1 tiene una distribución mundial con altas seroprevalencias. Distintos estudios han sido realizados para determinar la presencia de este virus.<sup>66,67</sup>

En 1974 el virus fue aislado por primera vez en California<sup>68</sup> y en 1979 en Suiza<sup>69</sup>, la infección ha sido identificada en Australia, Canadá, Estados Unidos, Nueva Zelanda y parece altamente predominante en Europa, especialmente en

la cuenca mediterránea. En Grecia el primer estudio se realizó en 1998 resultando en una seroprevalencia mayor al 50%.<sup>17, 70</sup>.

En España, el análisis con el kit comercial de ELISA de bloqueo (SERELISA) de 381 sueros de cabras distribuidas en varias explotaciones demostró que el CpHV1 se encontraba presente con una prevalencia del 21,3%<sup>71</sup> Como continuación de este estudio, se realizó una reactivación de dos cabras diagnosticadas como seropositivas usando 2.5 mg/kg de dexametasona intravenosa cada 24 horas durante 6 días consecutivos, lo que permitió el aislamiento de dos cepas de CpHV-1 en España, que son diferentes entre ellas y también diferentes de las cepas de Suiza, Estados Unidos e Italia <sup>71</sup>

En Francia, un estudio demostró una seroprevalencia de hasta 61.93%, usando un kit comercial de ELISA para diagnóstico de BoHV-1. Se emplearon 1118 sueros de cabras provenientes de regiones libres de BoHV-1. La especificidad de esta prueba fue de 95%, y la sensibilidad fue determinada a 93.5% Para ello se emplearon sueros de cabras experimentalmente infectadas con CpHV-1 tomadas a distintos días (n=31). Todas las muestras menos dos, fueron detectadas como positivas a partir del día 7 post infección.<sup>67</sup> En México no se han realizado estudios seroepidemiológicos sobre esta enfermedad.

## **ANTECEDENTES**

En México se han realizado pocos estudios referentes a la infección con CpHV-1. Sin embargo, Candanosa y Cobos (2011) informan sobre la posible presencia de esta enfermedad: un brote sospechoso a CpHV-1 ubicado en el

municipio de Tequisquiapan, Querétaro, en un rebaño de 244 cabras, en noviembre del 2008.<sup>72</sup>

En dicho brote se realizaron exámenes físicos previos al empadre en hembras y sementales de genotipo cárnico, y se detectaron lesiones vulvares y prepuciales, en las cuales se observó macroscópicamente vulvovaginitis pustular y ulcerativa multifocal coalescente de moderada a severa, y balanopostitis pustular y ulcerativa severa multifocal coalescente. Microscópicamente, además de las lesiones inflamatorias se observó la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos.

Las muestras de prepucio para microscopia electrónica refirieron la presencia de numerosas partículas virales dentro de los cuerpos de inclusión en el núcleo de un tamaño de 150 a 230 nm aproximadamente.

En el laboratorio de virología de la FMVZ UNAM se hizo el aislamiento viral en embrión de pollo y cultivo celular y se observó el efecto citopático sugerente a CpHV-1.<sup>72</sup> Dicho aislamiento mostró positividad al enfrentarlo a anticuerpos monoclonales específicos para la glicoproteína C del CpHV-1, mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta.<sup>73</sup>

En otro estudio retrospectivo realizado con cortes incluidos en parafina de los años 2010 y 2011 que consistió en la prueba de inmunohistoquímica resultaron positivos 28 de 45 muestras de este mismo rebaño.<sup>74</sup>

Es importante destacar que en el rebaño mencionado ha habido, al menos otras dos reactivaciones una en 2011 y 2013. En esta última se tomaron

muestras de suero que forman parte de las que se analizaron en el presente trabajo.

## **JUSTIFICACIÓN**

Dado que hay un informe que presupone la presencia de CpHV-1 en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en el Altiplano (CEIEPAA) y que existen informes de otros rebaños en la zona de Tequisquiapan, en los que se ha presentado la signología clínica sugerente a la enfermedad, es importante identificar al CpHV-1 por medio de PCR al igual que la presencia de anticuerpos contra herpesvirus en algunas zonas del país. Lo anterior se justifica por el hecho de que la enfermedad no se ha detectado en México, por lo que la confirmación molecular junto con hallazgos de serología positiva en cabras de otras regiones serían indicativos no solo de que el virus está presente en el CEIEPAA, sino de que éste podría estar circulando en otras zonas del país.

## **HIPÓTESIS**

En este trabajo se plantean dos hipótesis:

- 1) La signología presente en el rebaño caprino del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en el Altiplano (CEIEPAA) es sugerente a Herpesvirus Caprino tipo 1, por lo que será posible identificar molecularmente el virus obtenido a partir de lesiones en los animales sospechosos.

2) Si existe la presencia de CpHV-1 en México, habrá seroconversión en cabras de diferentes regiones del país y esta podrá ser detectada mediante la prueba de ELISA comercial anti gB de herpesvirus bovino.

## **OBJETIVO GENERAL**

Confirmar la presencia de CpHV-1 en México por medio de PCR; así como la detección de anticuerpos contra la gB de herpesvirus bovino, en sueros de cabras de diferentes regiones en México.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Demostrar la presencia de CpHV-1 en el rebaño caprino del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en el Altiplano (CEIEPAA) mediante la identificación molecular del aislamiento viral obtenido en 2008, para confirmar la existencia del virus en México.
- Confirmar la presencia de anticuerpos contra gB en cabras con historia clínica y lesiones sugerentes a CpHV-1, al momento del muestreo, pertenecientes al CEIEPAA, para asociar la seroconversión con la presencia del brote.
- Confirmar la presencia de anticuerpos contra gB en cabras del rebaño antes mencionado, con muestras de suero obtenidas en los años 2011 y del 2013, para analizar la seroconversión de los animales en este período.

- Detectar sueros positivos a CpHV-1 mediante la prueba de ELISA comercial anti IBR gB en diversos rebaños ubicados en distintos estados de la República Mexicana.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

El trabajo fue realizado en el laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología, perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM)

### **I. Análisis molecular**

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

**Virus.** Se utilizó un aislamiento obtenido a partir de una biopsia de prepucio del brote ocurrido en noviembre de 2008 en el municipio de Tequisquiapan, estado de Querétaro y que fue previamente identificado como Herpesvirus Caprino tipo 1, por medio de la técnica de inmunofluorescencia<sup>73,74</sup> usando anticuerpos monoclonales. La propagación del virus se llevó a cabo en embriones de pollo de 9 a 11 días de edad por inoculación en membrana corioalantoidea y en cultivo celular MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) cultivado con Medio Esencial Mínimo (MEM) como descrito por González, 2012.<sup>73</sup>

**ADN.** La extracción del ADN se hizo a partir del sobrenadante de cultivo celular infectado con el virus a estudiar, que presentó el efecto citopático esperado y a partir de una pústula en membrana corioalantoidea de embrión de

pollo infectado. Se hizo por medio de columnas comerciales QIAamp MinElute Viral ADN/ARN<sup>®</sup> con el siguiente protocolo:

- Agregar 0.20 uL de Proteasa K en un microtubo de 1.5 ml
- Agregar 200 uL de sobrenadante de cultivo celular
- Añadir 200 uL de Buffer AL a la muestra. Mezclar por Vortex por 15 segundos.
- Incubar 10 min a 56°C.
- Precipitar el ADN añadiendo 200 µl de etanol al 100%
- Mezclar por inversión 3-6 veces
- Transferir el sobrenadante a una columna Mini Spin contenida en un tubo colector.
- Centrifugar a 6 000 g, 1 min.
- Retirar el tubo colector con su contenido y poner la columna en un nuevo tubo colector.
- Añadir 500 uL a la columna de Buffer AW1 centrifugar 6 000 g por 1 minuto.
- Retirar el tubo colector con su contenido y poner la columna en un nuevo tubo colector.
- Añadir 500 uL a la columna de Buffer AW2 centrifugar 20 000 g por 3 minutos.
- Poner la columna en un micro-tubo de 1.5 ml. Añadir 30 uL de agua inyectable a la columna
- Centrifugar a 8 000 rpm para obtener el material genético.

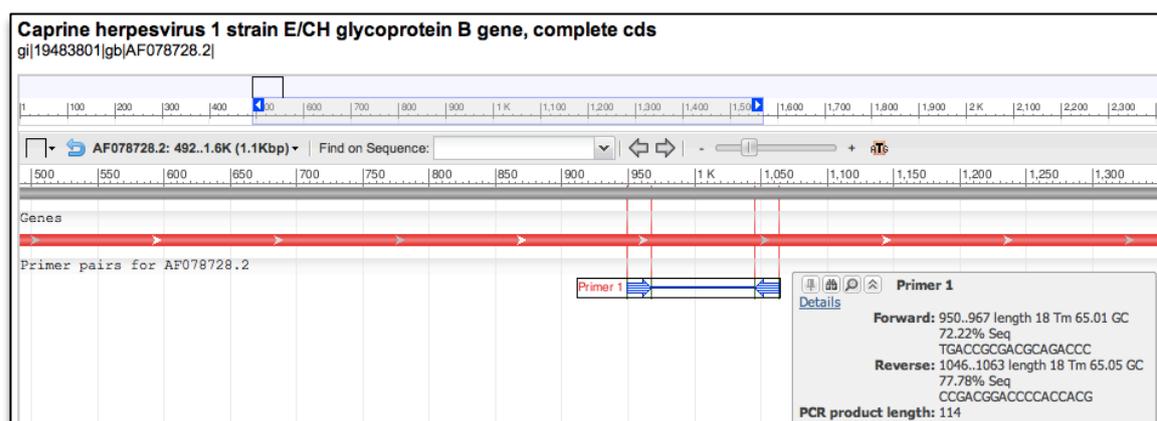
Posteriormente el ADN fue analizado con el equipo NanoDrop 2000

Spectrophotometer para su cuantificación.

**Amplificación gB.** Con la finalidad de confirmar la previa identificación de este virus como CpHV-1. Se diseñó, mediante el programa de cómputo especializado (Lasergene®software), un juego de iniciadores que amplifica una región conservada de 114 pb de la gB CpHV-1 (Ver cuadro 1). Para ello se alinearon las secuencias del gen de la gB del CpHV-1 cepa suiza, noruega y belga como se muestra en la Figura 8.

**Cuadro 1.**  
Iniciadores diseñados para amplificación de gB CpHV-1

	gB Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC %
<b>Forward primer</b>	TGACCGCGACGCAGACCC	Plus	18	45	62	65.01	72.22
<b>Reverse primer</b>	CCGACGGACCCCACCACG	Minus	18	158	141	65.05	77.78
<b>Product length</b>	114						



**Figura 8.** Alineación de iniciadores diseñados con la secuencia reportada para gB CpHV-1 en el NCBI.

Con la finalidad de manejar un testigo negativo para esta prueba, se usó ADN de un asilamiento de BoHV-1. Éste fue previamente identificado mediante una

PCR que amplifica la región de la glicoproteína E de BoHV-1. También para usarse como testigo negativo se realizó la extracción de cultivo celular MDBK no infectado. Se realizó un gradiente de temperatura con el fin de obtener la banda del tamaño deseado y eliminar bandeo inespecífico. El protocolo usado para los ciclos se describe en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.**  
Protocolo de reacción para la PCR de la región gB CpHV-1

Nombre del ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
- Desnaturalización	94°C	5 min	1 ciclo
- Disociación	95°C	5 seg	40 ciclos
- Asociación	58°C	5 seg	
- Extensión	72°C	10 seg	
- Extensión final	72°C	15 min	1 ciclo

**Purificación.** Se realizó la purificación de las bandas obtenidas del peso esperado, para su posterior secuenciación con el equipo E-Gel® Safe Imager™ Real-Time Transilluminator y E-Gel Size Select 2% según las recomendaciones del fabricante. Los amplificados fueron colocados cada uno en un pozo individual con un volumen de 20 uL, el gel se corrió por 10 minutos hasta que la banda esperada alcanzara el pozo de recepción correspondiente, el cual se preparó previamente con 20 uL de agua libre de RNAsas, para tomar el purificado.

**Secuenciación.** Con la finalidad de determinar si las bandas obtenidas correspondían a la glicoproteína en estudio se realizó la secuenciación en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Esta se llevó a cabo por duplicado usando los iniciadores Forward y Reverse para gB empleados previamente para la amplificación. Los resultados fueron analizados con 4-Peaks Software para lograr un consenso de las secuencias obtenidas.

## II. Análisis serológico

**Sueros.** Se utilizaron 686 sueros provenientes de diferentes estados: 451 sueros se obtuvieron del banco del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, y se distribuyeron de la siguiente forma: 88 sueros de una producción (Granja 1), en Querétaro, 51 sueros de 5 granjas en Puebla, 98 muestras de Guanajuato provenientes dos granjas; 139 sueros de 2 producciones, en el Distrito Federal, 52 sueros de 4 rebaños de Veracruz, 15 sueros de dos granjas en Nuevo León y 8 provenientes de Morelos, estos datos se muestran en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.**

Sueros provenientes del banco de sueros del departamento de Microbiología e Inmunología divididos por granja y estado, tomados de 2011 a 2013.

	<b>Granjas</b>	<b>Sueros</b>	<b>Total por Estado</b>
QUERÉTARO	Granja 1	88	88
PUEBLA	Granja 1	9	51
	Granja 2	10	
	Granja 3	11	
	Granja 4	10	
	Granja 5	11	
GUANAJUATO	Granja 1	52	98
	Granja 2	46	

DF	Granja 1	85	139
	Granja 2	46	
	Granja 3	8	
VERACRUZ	Granja 1	2	52
	Granja 2	12	
	Granja 3	9	
	Granja 4	10	
NUEVO LEÓN	Granja 1	6	15
	Granja 2	9	
MORELOS	Granja 1	8	8
<b>TOTAL</b>			<b>451</b>

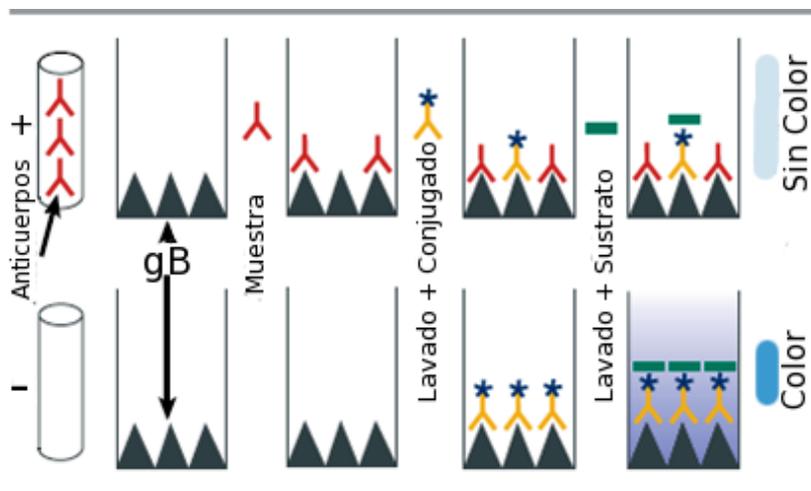
Además de estos sueros, también se analizaron otros 235 sueros provenientes de la granja de estudio: el CEIEPAA, las muestras de este rebaño se tomaron con dos fechas diferentes: 158 en el 2011 y 77 en 2013 (dos semanas posteriores a un brote con un cuadro sugerente a CpHV-1). Cabe señalar que de estas últimas 45 correspondían a las mismas cabras muestreadas en 2011, por lo que de estos se contaba con dos especímenes, como se representa en el cuadro 4. Por lo tanto, se analizaron 235 sueros provenientes de 190 animales del CEIEPAA.

**Cuadro 4.**  
Cabras muestreadas en años 2011 y 2013 en el CEIEPAA, el asterisco indica que se obtuvo muestra en ese año.

Id.	2011	2013	Id.	2011	2013	Id.	2011	2013	Id.	2011	2013
W9	*		S174	*		W150	*	*	X500	*	*
100	*		S176	*		W16	*		X51	*	
104	*		S177	*		W160	*		X53	*	
105	*		S178	*		W22	*		X54	*	
106	*		S179	*		W23	*		X55	*	*
113	*		T100	*	*	W24	*		X6	*	
114	*		T11	*		W24	*		X66	*	
116	*		T15	*		W25	*		X67	*	*
127	*		T19	*		W26	*	*	X68	*	
134	*		T24	*		W29	*		X7	*	*
184	*	*	T24	*		W33	*	*	X70	*	
904	*		T240	*		W48	*		X73	*	*
938	*		T30	*		W49	*		X74	*	*
940	*		T35	*		w51	*		X79	*	
958	*	*	T36	*		W52	*		X8	*	*
4103	*		T40	*		W56	*	*	x81		*
4108	*		t58	*		W59	*	*	X82	*	*
4133	*	*	T65	*	*	W6	*		X83	*	
316650		*	T650	*		W67	*		X89	*	
221796	*		T8	*		W7	*		X91	*	

94839	*		U1	*	*	W8	*	*	X92	*	
DESC	*		U29	*	*	W88	*		X94	*	
R01	*		U36	*		W92	*		y1		*
R03	*		U42	*		W93	*		y11		*
R05	*		U43	*		W94	*	*	y12		*
R06	*		U54	*	*	W96	*	*	y12		*
R118	*		U64	*	*	W97	*		y14		*
R123	*		u67		*	W99	*	*	y15		*
R125	*		U68	*		x07		*	y16		*
R129	*		U73	*	*	X10	*		y18		*
R130	*		U75	*		X12	*	*	y21		*
R14	*		U8	*		X17	*	*	y22		*
R14	*		U81	*		X21	*	*	y31		*
R142	*		U82	*		X22	*		y35		*
R143	*	*	U9	*		X23	*	*	y37		*
R16	*		W1	*	*	X25		*	y38		*
R25	*		w10		*	X27	*	*	y4		*
R32	*		W103	*	*	X33	*	*	y42		*
S104	*		W104	*		X34	*	*	y50		*
S115	*		W104*	*		X35	*		y51		*
S126	*		W105	*		X36	*		y54		*
S147	*		W112	*		X38	*	*	y55		*
S150	*	*	W116	*		X38	*		y56		*
S156	*		W12	*	*	X39	*		y59		*
S160	*	*	W126	*		X4	*		y60		*
S162	*		W14	*	*	X40	*	*	y65		*
S17	*		W15	*	*	X45	*		y69		*
						X47	*	*	y79		*

**ELISA.** Debido a que el virus de IBR presenta una reacción cruzada con el virus de CpHV-1, se empleó el kit comercial de ELISA de bloqueo Herdchek Anti-IBR gB (Idexx, Germany) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y lo previamente publicado por Thiry, 2008 (Figura 9):



**Figura 9.** Pasos en la prueba ELISA de bloqueo. Modificada de <http://www.vfad.com.my/elisa/>

Después de dejar que todos los reactivos adquieran temperatura ambiente, se marcó la posición de cada una de las muestras en la placa de 96 pozos fijada con gB, así como de los controles negativo y positivo que venían incluidos en el kit, los cuales se usaron por duplicado en cada una de las placas.

Se agregó 100 uL de cada suero en el pozo de la placa correspondiente, al igual que los controles. Se agitó levemente y luego de una incubación de dos horas a 37° C el suero fue retirado y se realizaron 5 lavados con 300 uL de la solución de lavado previamente diluida 1/10. Posteriormente se agregó 100 uL del conjugado IBR-gB HRPO (Anticuerpo monoclonal específico anti-gB con peroxidasa de rábano) en cada pozo y se incubó por una hora a temperatura ambiente. Se retiró el conjugado y se realizaron 5 lavados con 300 µl de solución de lavado con el fin de retirar los restos de conjugado que no estuvieran fijados a la placa y se agregó 100 µl de sustrato TBM (Tetrametilbenzidina) en cada pozo dejando incubar por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

Al terminar el tiempo de incubación, se agregó la solución de frenado (Acido Sulfúrico) usando el mismo orden que se usó para agregar el sustrato. Para la lectura de la absorbancia óptica de las muestras, se utilizó el espectofotómetro Multiskan EX (Thermo Electron Corporation) previamente calibrado en aire, a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados fueron calculados de la forma descrita en el Cuadro 5:

---

**Cuadro 5.**

Fórmula para obtener el porcentaje de bloqueo de las muestras y controles.

Cálculo del Control Negativo	Cálculo del Control Positivo	Cálculo de porcentaje de bloqueo de las muestras
$CN = \frac{CN1 A450 + CN2 A450}{2}$	$CP = \frac{CP1 A450 + CP2 A450}{2}$	$\% = \frac{CN - (DO \text{ muestra}) \times 100}{CN}$

Para considerar que el ensayo fue válido se consideró que la media del control negativo (CN) debía ser mayor o igual a 0,500 de densidad óptica (DO) y el control positivo (CP) debía tener un porcentaje mayor al 80%.

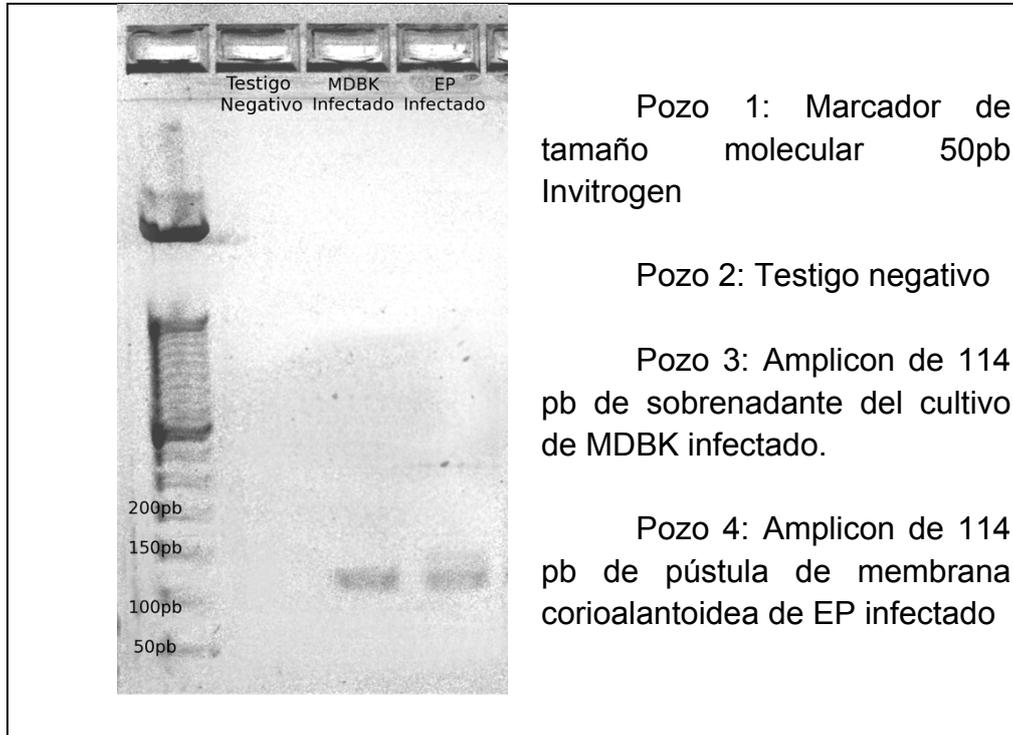
La interpretación de los resultados se hizo tomando como fuertemente positivas las muestras con un porcentaje de bloqueo  $\geq 70\%$ , ligeramente positivas  $\geq 45\%$ , como negativas  $< 40\%$  y como dudosas  $< 45\%$  a  $> 40\%$ . Las muestras positivas y sospechosas se analizaron por segunda vez para confirmar el resultado.

## RESULTADOS

### I. Análisis molecular.

**PCR gB.** Después de haber realizado la técnica de PCR en gradiente de temperatura, se seleccionó la temperatura de  $58^{\circ}\text{C}$ , debido a que apareció una banda cercana al tamaño del fragmento esperado (114 pb), tanto para la PCR de células MDBK infectadas, como en la PCR de embrión de pollo infectado.

**Purificación.** Después de la purificación de los productos en geles size-select 2%, se obtuvo una única banda del peso aproximado al esperado (114pb) en cada uno de los productos amplificados (Figura 10).

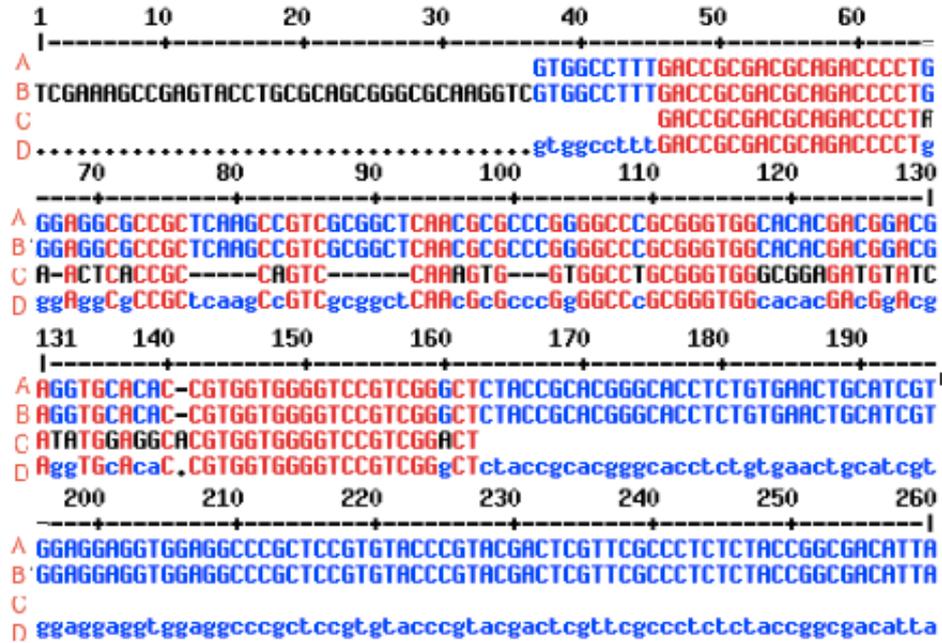


**Figura 10.** Gel de agarosa 2% donde se muestran las bandas obtenidas de aprox. 114pb posterior a la purificación.

**Secuenciación.** No se logró confirmar la presencia de CpHV-1 en México. Los resultados obtenidos en la secuenciación realizada en el Instituto de Fisiología Celular, tuvieron una similitud parcial con las secuencias publicadas para gB CpHV-1 (no. acceso: FJ917361.1, EF624477.1 y AF078728.2) y en menor medida gB BoHV-1 (no. acceso: JX898220.1) como se observa en las figuras 11, 12 y 13. Los resultados obtenidos se muestran en los anexos 1.1, 1.2, 1.3, y 1.4.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	104
MDBK	T	A	C	C	G	A	C	G	C	C	C	C
E.P.	G	A	C	C	G	A	C	G	C	C	C	C
Consensus	g	A	C	C	G	A	C	G	C	C	C	C

**Figura 11.** Alineación de las secuencias obtenidas a partir de los amplificadores de MDBK infectadas con CpHV-1 y embrión de pollo infectado con CpHV-1, la similitud entre las 2 secuencias se marca en rojo



**Figura 12.** Alineación de secuencia consenso obtenida con secuencias de referencia CpHV-1, la similitud entre las 3 secuencias se marca en rojo.

- A- Secuencia Herpesvirus Caprino tipo 1 No. acceso: FJ917361.1
- B- Secuencia Herpesvirus Caprino tipo 1 UL27 No. acceso: EF624477.1
- C- Secuencia consenso de los amplificadores obtenidos sospechosos a CpHV-1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<a href="#">Caprine herpesvirus 1 glycoprotein B gene, partial cds</a>	35.6	69.3	39%	0.017	100%	<a href="#">FJ917361.1</a>
<a href="#">Caprine herpesvirus 1 glycoprotein B (UL27) gene, partial cds</a>	35.6	69.3	39%	0.017	100%	<a href="#">EF624477.1</a>
<a href="#">Caprine herpesvirus 1 strain E/CH glycoprotein B gene, complete cds</a>	35.6	69.3	39%	0.017	100%	<a href="#">AF078728.2</a>
<a href="#">Bovine herpesvirus type 1.1 isolate NVSL challenge 97-11, complete genome</a>	28.3	28.3	17%	2.6	94%	<a href="#">JX898220.1</a>
<a href="#">Cercopithecine herpesvirus 9, complete genome</a>	28.3	54.9	23%	2.6	90%	<a href="#">AF275348.3</a>
<a href="#">Bovine herpesvirus type 1.1 complete genome</a>	28.3	28.3	17%	2.6	94%	<a href="#">AJ004801.1</a>
<a href="#">Bovine herpesvirus type 1 31-kb DNA (left genome end)</a>	28.3	28.3	17%	2.6	94%	<a href="#">Z54206.1</a>
<a href="#">Cercopithecine herpesvirus 7 glycoprotein B gene, complete cds</a>	28.3	28.3	19%	2.6	90%	<a href="#">U12388.1</a>
<a href="#">Bovine herpesvirus 1 strain IBRV-LJ glycoprotein B gene, partial cds</a>	26.5	26.5	18%	8.9	89%	<a href="#">JN106445.1</a>
<a href="#">Suid herpesvirus 1 strain DUL34Pass, complete genome</a>	26.5	26.5	18%	8.9	89%	<a href="#">JQ809330.1</a>
<a href="#">Suid herpesvirus 1 strain DUL34gfp, complete genome</a>	26.5	26.5	18%	8.9	89%	<a href="#">JQ809329.1</a>
<a href="#">Suid herpesvirus 1 strain Kaplan, complete genome</a>	26.5	26.5	18%	8.9	89%	<a href="#">JQ809328.1</a>
<a href="#">Cervid herpesvirus 2 isolate US 109754 glycoprotein B (UL27) gene, complete cds</a>	26.5	26.5	18%	8.9	89%	<a href="#">JF951970.1</a>
<a href="#">Cervid herpesvirus 2 isolate US 109762 glycoprotein B (UL27) gene, complete cds</a>	26.5	26.5	18%	8.9	89%	<a href="#">JF951969.1</a>
<a href="#">Cervid herpesvirus 2 isolate Davis 51 glycoprotein B (UL27) gene, complete cds</a>	26.5	26.5	18%	8.9	89%	<a href="#">JF951968.1</a>
<a href="#">Cervid herpesvirus 2 isolate Wales 4 glycoprotein B (UL27) gene, complete cds</a>	26.5	26.5	18%	8.9	89%	<a href="#">JF951967.1</a>
<a href="#">Cervid herpesvirus 2 isolate Wales 3 glycoprotein B (UL27) gene, complete cds</a>	26.5	26.5	18%	8.9	89%	<a href="#">JF951966.1</a>
<a href="#">Cervid herpesvirus 2 isolate Wales 1 glycoprotein B (UL27) gene, complete cds</a>	26.5	26.5	18%	8.9	89%	<a href="#">JF951964.1</a>

**Figura 13.** Resultados de alineación en la base de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI)

## II. Análisis serológico

**ELISA.** De un total de 641 animales que fueron analizados, se detectaron anticuerpos contra gB en 110 sueros de 6 estados, debido a que mostraron porcentaje de bloqueo por arriba de 45%, por lo que se consideran positivos en la prueba de ELISA gB.

Los estados de Morelos, Nuevo León, Puebla y Distrito Federal presentaron el mayor número de casos positivos. El estado de Veracruz no presentó ninguna positividad. De las muestras positivas del estado de Querétaro se consideró el resultado de la muestra tomada en 2013 para los sueros pareados.

---

**Cuadro 6.**

Resultados de la prueba de ELISA gB divididos por entidad federativa.

	Negativos	Positivos	%
<b>QUERÉTARO</b>	235	43	15.47%
<b>PUEBLA</b>	34	17	33.33%
<b>GUANAJUATO</b>	95	3	3.06%
<b>DISTRITO FEDERAL</b>	101	38	27.34%
<b>VERACRUZ</b>	52	0	0.00%
<b>NUEVO LEÓN</b>	10	5	33.33%
<b>MORELOS</b>	4	4	50.00%
<b>TOTAL</b>	<b>531</b>	<b>110</b>	<b>17.16%</b>

---

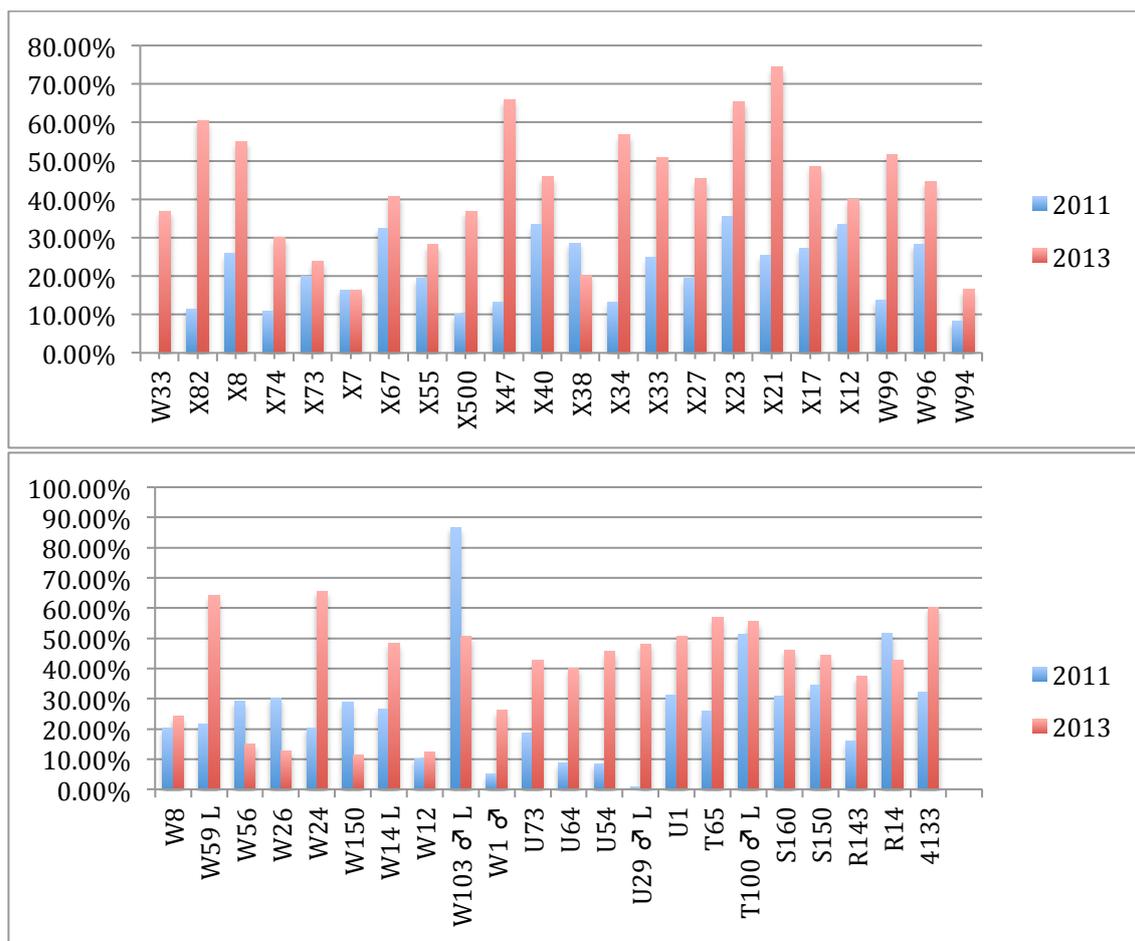
De las 235 muestras del CEIEPAA pudimos obtener 45 sueros pareados tomados en noviembre de 2011 y en marzo 2013. En las del año 2011 solo dos machos presentaron un porcentaje de bloqueo positivo, mientras que en las

tomadas durante 2013, después de la presentación de lesiones sugerentes a CpHV-1, se dio un aumento en el número de animales seropositivos; 19 animales cambiaron a un resultado positivo y dos machos conservaron su condición positiva obtenida en el muestreo anterior, como se muestra en el Cuadro 7 y Figura 14.

**Cuadro 7.**

Resultados de porcentaje de bloqueo en la prueba de ELISA en 45 sueros pareados del rebaño del rancho de estudio (CEIEPAA). Se indica el año de toma de muestra. Los resultados positivos se marcan en negritas, "L" indica que el animal presentaba lesión al momento del muestreo. "♂ L" indica macho con lesión sugerente a CpHV-1. El punto de corte para considerar positiva la prueba es  $\geq 45$  % de bloqueo.

Id. Cabra	2011	2013	Id. Cabra	2011	2013
W33	0.00%	36.78%	W8	20.39%	24.08%
X82	11.51%	<b>60.34%</b>	W59 L	21.66%	<b>64.27%</b>
X8	25.81%	<b>55.10%</b>	W56	29.11%	15.05%
X74	10.80%	29.97%	W26	30.17%	12.83%
X73	19.97%	23.95%	W24	20.25%	<b>65.54%</b>
X7	16.39%	16.36%	W150	28.76%	11.39%
X67	32.49%	40.71%	W14 L	26.65%	<b>48.30%</b>
X55	19.34%	28.14%	W12	10.13%	12.30%
X500	10.03%	36.91%	W103 ♂ L	<b>86.60%</b>	<b>50.52%</b>
X47	13.29%	<b>65.84%</b>	W1 ♂	5.06%	26.18%
X40	33.54%	<b>45.81%</b>	U73	18.71%	42.80%
X38	28.48%	20.29%	U64	8.61%	40.05%
X34	13.21%	<b>56.81%</b>	U54	8.49%	<b>45.55%</b>
X33	24.82%	<b>50.79%</b>	U29 ♂ L	0.67%	<b>48.17%</b>
X27	19.48%	<b>45.29%</b>	U1	31.29%	<b>50.79%</b>
X23	35.49%	<b>65.45%</b>	T65	25.81%	<b>56.81%</b>
X21	25.39%	<b>74.35%</b>	T100 ♂ L	<b>51.27%</b>	<b>55.50%</b>
X17	27.22%	<b>48.56%</b>	S160	30.87%	<b>45.94%</b>
X12	33.47%	40.05%	S150	34.46%	44.24%
W99	13.73%	<b>51.57%</b>	R143	15.96%	37.43%
W96	28.27%	44.50%	R14	<b>51.59%</b>	42.76%
W94	8.18%	16.49%	4133	32.14%	<b>60.34%</b>
958	20.39%	36.26%			



**Figura 14.** Resultados de ELISA en 45 sueros pareados obtenidos en 2011 y en 2013 del CEIEPAA en Tequisquiapan, Querétaro. Se observa un aumento en los porcentajes de bloqueo del año 2013 en comparación con 2011. “L” indica que el animal presentaba lesión al momento del muestreo. El punto de corte para considerar positiva la prueba es  $\geq 45\%$  de bloqueo.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se buscó confirmar la presencia de CpHV-1 por medio de la identificación molecular de un aislamiento realizado a partir de un brote sospechoso a herpesvirus caprino tipo I en Tequisquiapan, Querétaro, así como determinar la seropositividad en cabras de distintos estados de México.

La serología positiva hacia la gB del Herpes bovino tipo 1 (BoHV-1) en las muestras de cabras obtenidas de los estados de Querétaro, Puebla, Morelos,

Nuevo León, Distrito Federal y Guanajuato sugieren que estos animales pudieron estar en contacto con el CpHV-1. Los estudios realizados en 2008 por Thiry y Sagearman<sup>17,67</sup>, comprobaron que la prueba de ELISA de bloqueo anti gB, mostró una sensibilidad de 93% en cabras experimentalmente infectadas con CpHV-1 por lo que propusieron que éste es un método efectivo para detectar posibles casos de infección por herpesvirus caprino, lo anterior se justifica porque aún no existe un reactivo específico para herpesvirus caprino y a que hay antigenicidad cruzada hacia la gB, que es la glicoproteína más conservada entre los alfa herpesvirus, con un 98% de homología entre BoHV-1 y CpHV-1. Por este motivo se optó por usar el kit ELISA gB para detectar anticuerpos contra herpesvirus.

La positividad a la prueba no excluye la posible infección de las cabras por BoHV-1, ya que ésta puede detectar anticuerpos para ambos virus. Sin embargo, todos los estudios que se han generado sobre la seroepidemiología de la enfermedad se basan en la prueba citada. En el año de 1998 Grecia determinó una seroprevalencia mayor al 50%<sup>75</sup>, mientras que en otro estudio, se informó de una prevalencia del 21,3% en España y del 61.93% en Francia.

17,20,21

Los datos del presente estudio son insuficientes para determinar el estatus epidemiológico de la enfermedad en México, ya que solamente se obtuvieron muestras de ciertas regiones del país. Sin embargo, es importante señalar que este es el primer estudio que se realiza en el país para demostrar la presencia de anticuerpos hacia herpesvirus en cabras. De los 641 animales analizados el

17.7% (110) resultó positivo a la prueba de ELISA; llaman particularmente la atención los estados de Puebla y el Distrito Federal en los que se observó un porcentaje del 33.33% y 27.31% de positividad. Desafortunadamente, no se pudo hacer un análisis retrospectivo sobre posibles manifestaciones clínicas de la enfermedad ya que no se cuenta con los datos específicos de estos rebaños. Por otro lado, aún cuando Morelos y Nuevo León muestran un mayor porcentaje de seropositividad, los datos no pueden ser concluyentes por el bajo número de sueros estudiados.

Con respecto a Guanajuato, el porcentaje de muestras positivas fue del 3%, pero debido a que éstas provienen de un hato en el que no se han detectado casos de vulvovaginitis o balanopostitis, ni una alta incidencia de abortos o muerte neonatal, sería necesario confirmar el resultado con otras pruebas que aporten mayor especificidad al estudio. En este sentido, se proponen dos alternativas para confirmar la presencia de anticuerpos contra CpHV-1:

- 1) Realizar la prueba de ELISA anti gE de BoHV-1, debido a que esta glicoproteína es antigénicamente distante entre las dos especies virales y por lo tanto se esperaría que los sueros “verdaderos positivos a CpHV-1” fueran negativos a la ELISA de bloqueo gE, como lo informado por Thiry en 2008<sup>67</sup>.
- 2) Hacer una prueba de seroneutralización empleando tanto el virus BoHV-1 como el virus previamente aislado del hato sospechoso a CpHV-1<sup>73</sup>, para comparar el índice neutralizante entre ambos virus.

En el caso particular del CEIEPAA en Tequisquiapan, desde el 2008 a la fecha se han presentado manifestaciones clínicas sugerentes a la enfermedad en tres ocasiones y el resultado del monitoreo serológico de los animales en dos fechas diferentes (2011 y 2013) ha sido positivo, hace suponer que el virus está circulando en el hato desde hace algunos años. Aunado a esto, el aumento del porcentaje de bloqueo obtenido en la prueba de ELISA realizada a los animales 15 días después de observarse un brote con lesiones y signos característicos de herpesvirus indica que es posible que éstos hayan sido expuestos al virus o tuvieron una reactivación del mismo. En este sentido es importante destacar que dos de los machos que permanecen en el hato desde la aparición del primer brote dieron positivos en ambos muestreos y otro de ellos seroconvirtió en el 2013; de la misma forma hembras que eran jóvenes y negativas al momento del primer muestreo, seroconvirtieron una vez introducidas al sistema de empadre. El 75% de los animales que presentaban lesiones al momento del muestreo 2013 resultaron positivos a la prueba.

Con respecto a la identificación molecular del CpHV-1, no se logró demostrar la presencia de CpHV-1 por medio de PCR y secuenciación de una región específica de la gB a partir del aislamiento obtenido en el CEIEPAA, solo se obtuvo una similitud parcial con las secuencias publicadas para gB CpHV-1 (no. acceso: FJ917361.1, EF624477.1 y AF078728.2).

Aún cuando el tamaño del fragmento esperado era de 114 pb, solo se pudo resolver un fragmento de 104 pb, que corresponde al 91.2% del amplicón esperado. Este resultado pudo deberse a diversos factores que afectaran la

calidad y cantidad del producto de amplificación, como la degradación de DNA debido a errores en la manipulación de los productos de amplificación, o bien, que la purificación del producto no eliminara sales que interfieren con la secuenciación.

Sin embargo, la secuencia obtenida, aunque fue parcial, permitió su alineamiento con las secuencias publicadas en el genbank y mostró un porcentaje de similitud del 100% con algunas regiones, de las secuencias reportadas de CpHV-1, dentro de la misma región de 114 pb de la gB (números de acceso: FJ917361.1, EF624477.1 y AF0878728.2).

La principal problemática para cumplir con la identificación molecular es que, debido a que el virus nunca ha sido aislado en México, no podemos contar con un testigo positivo para la estandarización de la PCR, otro problema es el elevado porcentaje de guanina citosina (%g-c) que conforman a la secuencia genómica de la gB en los alfa herpesvirus de rumiante, lo que genera un alto grado de inespecificidad en la prueba, esto puede explicar que durante los ensayos obtuvimos bandas inespecíficas.<sup>76</sup>

Si bien los resultados de la secuenciación no mostraron el producto completo esperado los hallazgos de la secuenciación aunado a los signos clínicos y los resultados serológicos, indicarían la presencia de un virus altamente relacionado con CpHV-1, por lo que deberán plantearse otras estrategias para su identificación molecular. Dentro de ellas podemos destacar las siguientes:

- a) Mejorar la calidad de la secuenciación para obtener una secuencia más completa y sin bases degeneradas, esto se puede lograr aumentando la

calidad del amplificado que se envía y enviando las muestras a laboratorios diferentes con el fin de tener un punto de comparación entre ambos resultados.

- b) Realizar un estudio a partir del cultivo celular empleando la metagenómica, que es el estudio del conjunto de genomas de un determinado entorno (metagenoma) directamente a partir de muestras de ese ambiente, sin necesidad de aislar y cultivar esas especies. Es una de las nuevas aplicaciones que han sido posibles con la aparición de las tecnologías para secuenciar el ADN.<sup>77</sup>
- c) Diseñar una secuencia sintética en base a lo publicado en las secuencias de referencia para usarse como testigo positivo y de esta forma poder estandarizar mejor el protocolo de PCR. Esto también podría eliminar la necesidad de purificar el producto lo que podría ayudar a tener un mejor resultado en la secuenciación. Es importante mencionar que debido a que las cepas caprinas de referencia son la suiza e italiana, sería posible una diferencia entre las secuencias obtenidas y la del testigo positivo.

Finalmente, aunque la infección experimental, latencia y reactivación en cabras por el virus bovino ha sido confirmada, los informes de infección natural son escasos<sup>78</sup> y en ninguno de ellos se menciona que las cabras presenten las lesiones descritas para la infección con CpHV-1<sup>78, 79</sup>. Por lo tanto, en el caso del CEIEPAA, la historia clínica del rebaño, los hallazgos serológicos previamente mencionados en este estudio, junto con el trabajo realizado por Llanos<sup>73</sup>, en un estudio retrospectivo de tejidos con lesiones sugerentes CpHV-1 del 2010 y 2011, en el que se encontró un 62% de muestras positivas

por IHQ usando anticuerpos monoclonales, así como la previa identificación por inmunofluorescencia del asilamiento obtenido en este rebaño<sup>72,73</sup>, sugiere que el caso está asociado a una infección con CpHV-1.

## **CONCLUSIONES**

No se logró identificar al virus aislado del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en el Altiplano, mediante PCR y secuenciación como CpHV-1, sin embargo los resultados sugieren un virus altamente relacionado.

Se detectó la presencia de anticuerpos contra  $\alpha$ -herpesvirus en cabras de los estados de Puebla, Morelos, Nuevo León, Distrito Federal, Guanajuato y Querétaro. En este último existió una correlación con la presencia de lesiones sospechosos a CpHV-1 en el mismo rebaño. El estado de Veracruz resultó negativo.



## LITERATURA CITADA

---

1 Fields BN, Howley MD (Editor), Diane E., Ph.D. Griffin (Editor), Robert A., Ph.D. Lamb (Editor), Malcolm A., MD Martin (Editor), Bernard Roizman (Editor), Stephen E., Straus MD (Editor), Ph.D. Knipe (Editor) By Lippincott Williams & Wilkins Publishers. 4th Edition, 2001

2 International Committee on Taxonomy of viruses, in: ICTVdB Index of Viruses, Appendix 00.031 herpesviridae [online] Available from: URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs\\_herpe.htm](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_herpe.htm)

3 Six A, Banks M, Engels M, Ros C Bascuñana, and Ackermann C. Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus 1 (CapHV-1) in calves. Arch Virol 2001;146: 1325–1335

4 Piñol, RJ, Querol ME, Serra HX, Expresión de la Glicoproteína E del BoHV-1 en Escherichia coli. Determinación de una Secuencia Citotóxica (Tesis Doctorado en ciencias).Bellaterra (Barcelona) España: Universidad Autónoma de Barcelona. 2004.

5 Pertel PE, Spear PG. Biology of herpesviruses. Sexually Transmitted Diseases. 3rd edition. New York: McGraw-Hill Book Co. 1999.

6 Ros C, Belák S, Characterization of the glycoprotein B gene from ruminant alphaherpesviruses. Virus Genes. 2002; 24: 99-105

7 Ros C, Belák S. Studies of Genetic Relationships between Bovine, Caprine, Cervine, and Rangiferine Alphaherpesviruses and Improved Molecular Methods for Virus Detection and Identification. J Clin Microbiol. 1999;37(5):1247-53.

8 Thiry J, Keuser V, Muylkens B, Meurens F, Gogev S., Thiry E, et al. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. Veterinary Research. 2006; 37:169-190.

9 Griffin AM. The nucleotide sequence of the glycoprotein gB gene of infectious laryngotracheitis virus: analysis and evolutionary relationship to the homologous gene from other herpesviruses, J. Gen. Virol. 1991; 72: 393-398.

10 Keuser V., Detry B., Thiry J., de Fays K., Schynts F., Pastoret P., Vanderplasschen A., Thiry E. Characterization of caprine herpesvirus 1 glycoprotein D gene and its translation product. Virus Res. 2006; 115: 112-121.

11 Ros C., Riquelme M. E., Ohman-Forslund K, Belák S. Improved detection of five closely related ruminant alphaherpesviruses by specific amplification of viral genomic sequences. J. Virol. Methods. 1999; 83:55–65.

12 Thiry J., Keuser V., Muylkens B., Meurens F., Gogev S., Thiry E, et al. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. Veterinary Research. 2006; 37:169-190.

13 Roizman B., Pellet P. The family herpesviridae: A brief introduction. 4th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins. 2001.

- 
- 14 Rijsewijk, F. A., Verschuren, S. B., Madic, J., Ruuls, R. C., Renaud, P. & van Oirschot, J. T. Spontaneous BHV1 recombinants in which the gI/gE/US9 region is replaced by a duplication/inversion of the US1.5/US2 region. *Arch Virol* 1999,144, 1527–1537.
- 15 Zajac MM, Romera AS, Ladelfa MF, Kotsias F, Delgado F, Thiry J, Meuren F, Keil G, Thiry E and Benoît M. *In vitro*-generated interspecific recombinants between bovine herpesviruses 1 and 5 show attenuated replication characteristics and establish latency in the natural host. 18 May 2011 Del Medico Zajac et al. *BMC Veterinary Research* 2011, 7:19
- 16 Thiry E, Muylkensa B, Meurensa F, Gogeva, S, Thiry J, Vanderplasschena A, Schynts F. Recombination in the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1 *Veterinary Microbiology* Volume 113, Issues 3–4, 31 March 2006, Pages 171–177
- 17 Engels M., Ackermann M., Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Veterinary Microbiology*. 1996; 53: 3-15.
- 18 Tempesta M., Pratelli A., Normanno G., Camero M., Buonavoglia D. Greco G., Buonavoglia C., Experimental intravaginal infection of goats with caprine herpesvirus 1, *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 47 (2000) 197-201.
- 19 Saito, JK., Gribble, DH., Berrios, PE., Knight, HD. & mckercher, DG. (1974). A new herpesvirus isolate from goats: preliminary report. *American journal of veterinary research*35, 847-848
- 20 Tarigan S, Webb RF, Kirkland D, Caprine herpesvirus from balanoposthitis. *Aust Vet J.* 1987; 64:321.
- 21 Tempesta M., Camero M., Sciorsci R.L., Greco G., Minoia R., Martella V., Pratelli A., Buonavoglia C., Experimental infection of goats at different stages of pregnancy with caprine herpesvirus 1, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27 (2004a) 25-32.
- 22 Keuser V., Gogev S., Schynts F., Thiry E., Demonstration of generalized infection with caprine herpesvirus 1 diagnosed in an aborted caprine fetus by PCR, *Vet. Res. Commun.* 26 (2002) 221-226.
- 23 Williams NM, Vickers ML, Tramontin RR, Petrites-Murphy MB, Allen GP. Multiple abortions associated with caprine herpesvirus infection in goat herd. *J Am Vet Med Assoc* 1997;211: 89–91.
24. Uzal, FA, Woods L, Stillian M, Nordhausen R, Read RH, Van Kampen H, Odani J, Hietala S, Hurley EJ, Vickers MJ, Abortion and ulcerative posthitis associated with caprine herpesvirus-1 infection in goats in California *J Vet Diagn Invest* 2004; 16:478–484
- 25 M. Tempesta, A. Pratelli, M. Corrente, C. Buonavoglia. A preliminary study on the pathogenicity of a strain of caprine herpesvirus-1. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 22 (1999) 137±143
- 26 Mettler F., Engels M., Wild P., Bivetti A., Herpesvirus-infektion bei Ziecklein in der Schweiz, *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 121 (1979) 655-662.

- 
- 27 Roperto F, Pratelli A, Guarino G. Natural caprine Herpesvirus 1 (CpHV-1) infection kids. *J Comp Path.* 2000; 122: 298-302.
- 28 Henderson G, Perng GC, Nesburn AB, Wechsler SL, Clinton C. The latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 can suppress caspase 3 and caspase 9 cleavage during productive infection. *J Neurovirol.* 2004 ;10: 64-70.
- 29 Henderson G, Zhang Y, Inman M, Jones D, Jones C. Infected cell protein 0 encoded by bovine herpesvirus 1 can activate caspase 3 when overexpressed in transfected cells. *J Gen Virol.* 2004 ; 85: 3511-3516.
- 30 Wittels, M. & Spear PG. Penetration of cells by herpes simplex virus does not require a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Research.* 1990; 18: 271-29.
- 31 Li Y., Liang X., Van Drunen Littel-Van Den Hurk S., Attah-Poku S, Babiuk L.A. Glycoprotein Bb, N-terminal subunit of bovine herpesvirus-1 glycoprotein B, can bind to heparan sulfate on the surfaces of Madin-Darby bovine kidney cells. *J Virol.* 1996; 70: 2032-2037.
- 32 Li Y, Van Drunen Littel-Van Den Hurk S, Babiuk LA, Liang X. Characterization of Cell Binding Properties of Bovine Herpesvirus-1 Glycoprotein B, C and D: Identification of a Dual Cell Binding Cell Function of gB. *J Virol.* 1995;69:4758-4768.
- 33 Schroder C, Keil GM. Bovine herpesvirus-1 requires glycoprotein H for infectivity and direct spreading, and glycoproteins gH(W450) and gB for gD independent cell-to-cell spread. *J Gen Virol.* 1999; 80: 57-61.
- 34 Rue C.A., Ryan P. A role for glycoprotein C in pseudorabies virus entry that is independent of virus attachment to heparan sulfate and which involves the actin cytoskeleton. *Virology* . 2003; 307: 12–21
- 35 Roizman B., Pellet P. The family herpesviridae: A brief introduction. 4th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins. 2001.
- 36 Hunter E.. In: Knipe, DM., Howley, PM., Fields, editors. *Virus Assembly Virology*. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins Press, 2001: 171-197.
- 37 Meurens F, Schynts F, Keil G.M, Muylkens B, Vanderplasschen A, Gallego P, et al. Superinfection prevents recombination of the alphaherpesvirus bovine herpesvirus-1. *J Virol.* 2004; 78: 3872-3879.
- 38 Babiuk L.A, Van Drunen Littel-Van Den Hurk S., Tikoo S.K. Immunology of Bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol.* 1996; 53: 31-42.
- 39 Flint SJ, Enquist LW, Krug RM. Principles of virology, Molecular Biology, pathogenesis, and control. ASM Press, Washinton D.C., 2000
- 40 Jennifer R Kent, Wen Kang, Cathie G Miller, and Nigel W Fraser Herpes simplex virus latency-associated transcript gene function. *ournal of NeuroVirology*, 9: 285–290, 2003

- 
- 41 Ruiz J., Jairo J, Vera V. Latencia del Herpesvirus tipo 1: El papel de los Transcritos Relacionados con Latencia (RL) (tesis de doctorado en ciencias). Bogotá Colombia. Universidad Nacional de Colombia.2008
- 42 Bratanich AC, JONES C. Localization of Cis-Acting Sequences in the Latency-Related Promoter of Bovine Herpesvirus 1 Which are Regulated by Neuronal Cell Type Factors and Immediate-Early Genes. *J Virol.* 1992;68:6099-6106.
- 43 Flint SJ, Enquist LW, Krug RM. Principles of virology, Molecular Biology, pathogenesis, and control. ASM Press, Washinton D.C., 2000
- 44 Jennifer R Kent, Wen Kang, Cathie G Miller, and Nigel W Fraser Herpes simplex virus latency-associated transcript gene function. *ournal of NeuroVirology*, 9: 285–290, 2003
- 45 Buonavoglia, CM. Tempesta, A. Cavalli, V. Voigt, D. Buonavoglia, A. Conserva, and M. Corrente. 1996. Reactivation of caprine herpesvirus 1 in latently infected goats. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1996; 19:275–281.
- 46 Tempesta M, Pratelli A, Greco G, Martella V, and Buonavoglia C. Detection of Caprine Herpesvirus 1 in Sacral Ganglia of Latently Infected Goats by PCR. *Clin Microbiol.* 1999 May; 37(5): 1598–1599.
- 47 Cabello RR. Microbiología y parasitología humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Ed. Médica Panamericana, Jun 30, 2007 - 999 pages
- 48 Jonjic S, Babic M, Polic B. Immune evasion of natural killer cells by viruses. *Curr Opin Immunol.* 2008 February ; 20(1): 30–38.
- 49 Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Inmunología de Kuby Spanish. Editorial McGrawHill. 6ta Edición, 2010. 697 Páginas
- 50 Friedman, HM, Cohen GH, Eisenberg RJ, Seidel CA, and Cines DB. Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 acts as a receptor for the C3b complement component on infected cells. *Nature* 1984; 309:633-635.
- 51 .Friedman, HM., Wang L, Fishman NO, Lambris JD, Eisenberg RJ, Cohen GH, and J. Lubinski. Immune evasion properties of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC. *J. Virol.* 1996; 70: 4253-4260.
- 52 Lubinski JM, Jiang M., Hook L., Chang Y., Sarver C., Mastellos, D., et al. H. M. Herpes Simplex Virus Type 1 Evades the Effects of Antibody and Complement In Vivo. *J. Virol.* 2002; 76: 9232-9241.
- 53 Lubinski, JM., Wang L., Soulika AM., Burger R., Wetsel RA and Friedman, HM. Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein gC Mediates Immune Evasion In Vivo. *J. Virol.* 1998; 72: 8257-8263

- 
- 54 Jianmin Z and Rowe M. Herpesviruses Placating the Unwilling Host: Manipulation of the MHC Class II Antigen Presentation Pathway *Viruses* 2012, 4, 1335-1353; ISSN 1999-4915. University of Birmingham,
- 55 Hewitt EW. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. School of Biochemistry and Molecular Biology, University of Leeds, Leeds, UK *Immunology* 2003 110 163±169.
- 56 Lipinska, AD., Koppers-Lalic, D., Rychlowski, M., Admiraal, P., Rijsewijk, F.A., Bienkowska-Szewczyk, K., Wiertz, E.J., 2006. Bovine herpesvirus 1 UL49.5 protein inhibits the transporter associated with antigen processing despite complex formation with glycoprotein M. *J. Virol.* 2006; 80, 5822–5832.
- 57 Horner GW, Hunter R, Day AM. An outbreak of vulvovaginitis in goats caused by a caprine herpesvirus. *NZ Vet J.* 1982; 30:150-152. *Aust Vet J.* April 2008; 86: 136-138
- 58 Grewal AS, Wells R: 1986, Vulvovaginitis of goats due to a herpesvirus. *Aust Vet J* 63:79–82.
- 59 McCoy HM, Montgomery LD, Bratanich CA, et al. Serologic and reproductive findings after a Herpesvirus-1 abortion storm in goats. *J Am Vet Med Assoc* 2007; 231: 1236-1239.
- 60 Roperto F, Pratelli A, Guarino G, et al. Natural caprine Herpesvirus 1 (CpHV-1) infection kids. *J Comp Path* 2000; 122: 298-302.
- 61 Berrios PE, McKercher DG, Knight HD: Pathogenicity of a caprine herpesvirus. *Am J Vet Res* 1975; 36:1763–1769.
- 62 Van der J. J. and Randles, J. L. . Systemic herpesvirus infection in neonatal goats. *Journal of the South African Veterinary Association*, 1993;64, 169–171.
- 63 Lemaire, M., Schynts, F., Meyer, G., Thiry, E., Antibody response to glycoprotein E after bovine herpesvirus type 1 infection in passively immunised, glycoprotein E-negative calves. *Vet. Rec.* 1999; 144, 172–176
- 64 Marinaro M, Bellacicco AL, Tarsitano E, Camero M, Colao V, Tempesta M, Buonavoglia C. Detection of Caprine herpesvirus 1-specific antibodies in goat sera using an enzyme-linked immunosorbent assay and serum neutralization test. *J. Vet. Med. B* 47, 197–201 (2000)
- 65 Elia G, Tarsitano E, Camero M, Bellacicco AL, Buonavoglia D, Campolo M, Nicola Decaro, Thiry Jb, Tempesta M. Development of a real-time PCR for the detection and quantitation of caprine herpesvirus 1 in goats. *Journal of Virological Methods* 148;155–160 (2008).
- 66 Thiry J y Thiry E. El Herpesvirus es altamente prevalente. *Mundo Veterinario.* 2008; 214: 32-35.
- 67 Thiry J, Saegerman C, Chartier C, Mercier P, Keuser V y Thiry E Serological evidence of caprine herpesvirus 1 infection in Mediterranean France. *Vet. Microbiol.* 2008; 128: 261–268

- 
- 68 Saito, J.K., Gribble, D.H., Berrios, P.E., Knight, H.D. & Mckercher, D. G. . A new herpesvirus isolate from goats: preliminary report. *American Journal of Veterinary Research* 1974;35, 847-848.
- 69 Mettler, F., Engels, M., Wild, P. & Bivetti, A. (). Herpesvirus-Infektion bei Zicklein in der Schweiz. *Schweizer Archiv ffr Tierheilkunde* 1979;121, 655-662.
- 70 Koptopoulos, G., Papanastasopoulou, M., Papadopoulos, O., Ludwig, H.,. The epizootiology of caprine herpesvirus (BHV- 6) infections in goat populations in Greece. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1988;11, 199–205.
- 71 Keuser, V., Espejo-Serrano, J., Schynts, F., Georgin, J.P., Thiry, E.,. Isolation of caprine herpesvirus type 1 in Spain. *Vet. Rec.* 2004;154, 395–399.
- 72 Candanosa AE, Sierra GM, Sánchez A, Salas G, Méndez A, Cobos L, et al. Vulvovaginitis y balanopostitis pustular sugerente a herpesvirus caprino-1 en cabras (Querétaro, México) *Vet. Méx.*, 42 (3) 2011
- 73 González Delgado LS. Aislamiento, identificación molecular y serológica del herpesvirus caprino tipo 1 en un hato ubicado en Tequisquiapan, Querétaro, México. (Tesis de Licenciatura) D.F. México. UNAM. 2012
- 74 Llanos Salinas, SP. Diagnóstico de herpes caprino por medio de la técnica de inmunohistoquímica. (Tesis de Licenciatura) UNAM, México. 2012.
- 75 Koptopoulos, G., Papanastasopoulou, M., Papadopoulos, O., Ludwig, H.,. The epizootiology of caprine herpesvirus (BHV- 6) infections in goat populations in Greece. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1988;11, 199–205.
- 76 Sambrook. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 3<sup>a</sup> ed. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- 77 Gail L. Rosen., Bahrad A. Sokhansanj., Robi Polikar., Mary Ann Bruns., Jacob Russell., and Elaine Garbarine. Signal Processing for Metagenomics: Extracting Information from the Soup. *Current Genomics*. 2009; 10: 493-510
- 78 Tolari, F., White, H., Nixon, P.,. Isolation and reactivation of bovid herpesvirus 1 in goats. *Microbiologica* 1990;13, 67–7
- 79 A. Six, M. Banks, M. Engels, C. Ros Bascuñana, and M. Ackermann Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus 1 (CapHV-1) in calves *Arch Virol* (2001) 146: 1325–1335