



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad De Estudios Superiores Cuautitlán

**DETECCIÓN DE HERPESVIRUS CANINO MEDIANTE LA TÉCNICA DE
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TEJIDOS DE
CADÁVERES REMITIDOS PARA DIAGNÓSTICO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A:

Briones Vera Jose Carlos

ASESOR:

Dr. Guillermo Valdivia Anda

COASESOR:

Dr. Francisco Montiel Sosa

Cuautitlán Izcalli, Estado de México

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ÍNDICE	Página
Resumen	4
Introducción	5
Herpesvirus	5
Virus Herpes Canino	6
Transmisión	8
Epidemiología	8
Patogénesis	8
Hallazgos a la necropsia	9
Tratamiento	10
Medicina preventiva	11
Diagnóstico	11
Reacción en Cadena de la Polimerasa	12
Antecedentes	16
Hipótesis	17
Objetivos	18
Justificación	19
Materiales y Métodos.....	20
I.-Selección de las muestras	20
II.-Identificación de las muestras	20
III.-Reacción en Cadena de la Polimerasa	21
IIIa.-Extracción del ADN	21
IIIb.-Cuantificación del ADN	22
IIIc.-Reacción en Cadena de la Polimerasa	23
IIId.-Electroforesis en gel de agarosa	25
Resultados	27
Discusión	37
Conclusiones	43
Recomendaciones	44
Glosario.....	45
Bibliografía	49

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1. Árbol filogenético de los herpes virus.....	6
Figura 2. Estructura del herpesvirus canino.....	7
Figura 3. Hallazgos a la necropsia.....	10
Figura 4. Representación del mecanismo de la PCR.....	14
Figura 5. Diagrama del programa de amplificación optimizado empleado en este trabajo.....	15
Figura 6. Fotografía del gel de agarosa al 3% de la PCR 7.....	31
Figura 7. Fotografía del gel de agarosa al 3% de la PCR 9.....	32
Figura 8. Fotografía del gel de agarosa al 3% de la PCR 10.....	33

ÍNDICE DE CUADROS	Página
Cuadro 1. Datos de los pacientes.....	27
Cuadro 2. Identificación de las muestras trabajadas.....	28
Cuadro 3. Cálculo de la concentración de ADN de las muestras de CHV con el espectrofotómetro.....	29
Cuadro 4. Concentración de reactivos optimizada en el presente trabajo.....	30
Cuadro 5. Programa de amplificación optimizado empleado en este trabajo.....	30
Cuadro 6. Resultado de la PCR 10 estandarizada con todas la muestras.....	32
Cuadro 7. Sensibilidad de la técnica de PCR contra el diagnóstico histopatológico en animales de 2 meses de edad o menores.....	35
Cuadro 8. Sensibilidad de la técnica de PCR contra el diagnóstico histopatológico en los animales utilizados en este trabajo.....	36
Cuadro 9. Especificidad de la técnica de PCR contra la inmunofluorescencia de los 5 animales en los que se realizó la prueba de IF.....	36

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue identificar la presencia del herpesvirus canino por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en muestras biológicas provenientes de animales remitidos a necropsia a DIVET (Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario) donde el diagnóstico morfo-patológico e histopatológico sugirió infección por herpesvirus canino, con el propósito de documentar la presencia del virus en México. Se trabajaron 26 muestras de tejido y 3 fluidos, provenientes de 13 casos clínicos. Se extrajo el ADN por el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se cuantificó con un espectrofotómetro de luz UV. En 5 de los casos se realizó previamente la prueba de inmunofluorescencia, siendo positivos para herpesvirus. Se tomó una técnica descrita en la bibliografía, pero no se obtuvieron resultados, por lo que se decidió modificarla. Tras la modificación de la técnica, se obtuvieron amplificadores de un tamaño mayor al esperado en 12 de los 13 casos de animales, pero considerando los estudios como el diagnóstico morfo-patológico e histopatológico sugirieron infección por herpesvirus canino, incluyendo también a los 5 que fueron positivos en la inmunofluorescencia. Se realizaron los cálculos para obtener la sensibilidad y la especificidad de la PCR contra el estudio histopatológico e inmunofluorescencia, siendo del 100%. En conjunto la PCR realizada, el diagnóstico histopatológico del laboratorio y la inmunofluorescencia indican la presencia del herpesvirus canino en México.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas en recién nacidos son una de las principales causas de muerte neonatal, agentes etiológicos como adenovirus, paramixovirus, coronavirus y parvovirus son algunos de los más reconocidos, sin embargo se ha descrito el herpesvirus canino como patógeno importante (Carmichael, 2004).

El herpesvirus canino es importante para los criadores, teniendo en cuenta que causa una marcada disminución en la reproducción de sus criaderos y pueden causar serias pérdidas en sus cachorros neonatos. Se producen enfermedades debilitantes cuando actúa como agente único; pero provoca graves alteraciones si se complica con otros agentes infecciosos, además de afectar a perros adultos (Rodes, 2003).

Los hallazgos clínicos como muerte neonatal, necropsias con lesiones típicas de virus herpes y exámenes histopatológicos, así como otras pruebas de laboratorio confirman la presencia del virus (Navarro *et al*, 2003; Oliveira *et al*, 2009).

Herpesvirus

Los herpesvirus son los virus ADN más grandes que usan enzimas de la célula hospedera para funciones importantes como expresión y replicación del genoma viral. Taxonómicamente se han descrito tres subfamilias (Figura 1), alpha (virus citolítico de crecimiento rápido), beta (produce agrandamientos celulares citomegálicos de crecimiento lento) y gamma (se desarrollan en los linfocitos y causan procesos neoplásicos), diferenciadas originalmente en base a sus propiedades biológicas tal como rangos de hospederos, tiempo de sus ciclos de replicación, efectos en las células del hospedador y tipos de infecciones latentes establecidas. Actualmente, se identifican de acuerdo a su similitud genómica. Una característica importante de los herpesvirus de aves y mamíferos es su habilidad para establecer estado de latencia. En estado latente son demostrables múltiples copias de ADN viral como episomas (libre en el núcleo celular) sin síntesis activa de proteínas virales ni precursores. Frecuentemente los alpha herpesvirus llegan a estar latentes en neuronas del ganglio craneal o sacro; los beta herpesvirus en glándulas

secretoras, riñones y los gammaherpesvirus en células linfoides (Fenner *et al.*, 1992; Voyles, 2002).

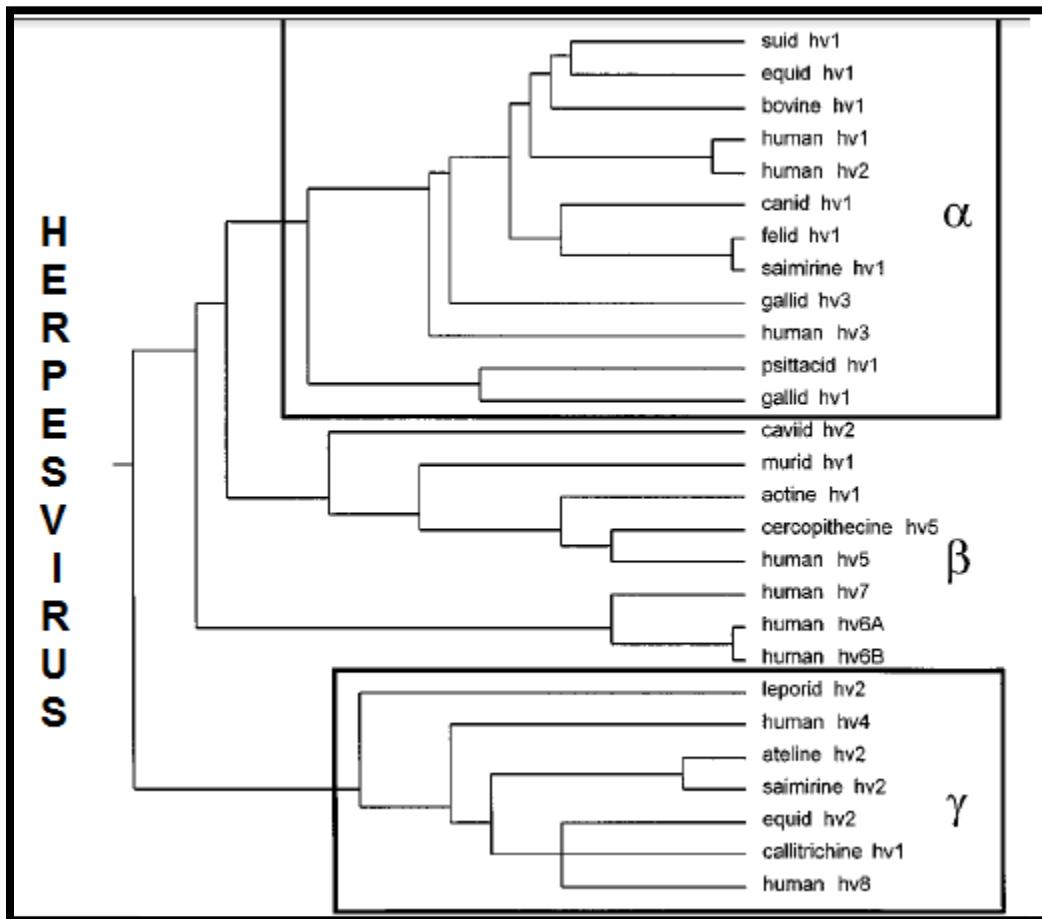


Figura 1. Árbol filogenético de los herpesvirus que muestra los 3 grupos en que se divide la familia herpesviridae: alpha, beta y gamma (VanDevanter *et al.*, 1996).

Virus herpes canino

El virus herpes canino tipo 1 (CHV-1), es considerado como responsable de la enfermedad hemorrágica canina. También es asociado a enfermedad respiratoria (Traqueobronquitis infecciosa canina) y ocular en perros jóvenes y adultos (Ronsee *et al.*, 2004).

Este virus pertenece a la subfamilia Alphaherpesvirinae (cepas virales capaces de realizar ciclos líticos en las células que infectan, son de propagación rápida y producen infecciones latentes) (Boehmer y Lehman, 1997); Género Varicellovirus. Posee ADN

bicatenario, lineal y cápside de simetría icosaédrica constituida por 162 capsómeros. Rodeando la cápside se encuentra el tegumento, capa amorfa que contiene numerosos polipéptidos con actividad enzimática. Rodeando al tegumento finalmente se halla la envoltura que presenta espículas, muchas de la cuales son las responsables de inducir la respuesta inmune en el huésped. Por la pleomorficidad de esta envoltura el diámetro de la partícula viral oscila entre 150 y 200 nm (Figura 2). El genoma pertenece al tipo “D” de los herpesvirus y se caracteriza por poseer una región interna con secuencias repetidas que flanquean la denominada región única corta (US). Esta región puede invertirse con respecto a la región única larga (UL) obteniéndose dos tipos isoméricos en la progenie viral de una célula infectada. (Roizman *et al*, 1992; ICTVdb, 2005).

El virus es sensible a los solventes lipídicos y es inactivado a temperaturas superiores a los 40°C (su vida media a 37°C es menor a 5 horas). Es inestable aun pH menor a 5 y mayor a 8. Es estable entre los 40°C y -70°C, pero se inactiva a los -200°C al menos que se agreguen soluciones estabilizadoras. Generalmente es rápidamente inactivado por los desinfectantes comunes. El virus solo se desarrolla en líneas celulares caninas y su cultivo de primera elección se lleva a cabo en células de riñón o de testículo, produciendo un efecto citopático caracterizado por focos líticos, formación de células gigantes y cuerpos de inclusión intranucleares (Carmichael, 2004).

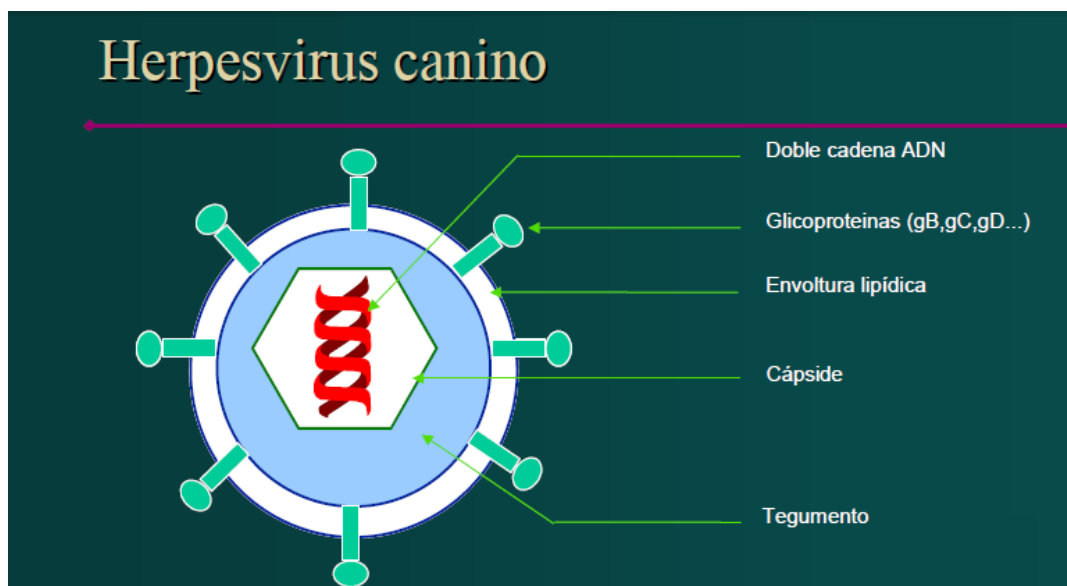


Figura 2. Estructura del herpesvirus canino (Rodes, 2003).

Transmisión

El virus puede transmitirse *in útero*, así como por secreciones oronasales, contacto sexual y rara vez por fómites. En la enfermedad neonatal, los cachorros se infectan por vía oronasal, generalmente mediante lamidos de sus madres infectadas o por contacto directo con otros perros infectados. Las infecciones transplacentarias pueden ocurrir en la mitad o último tercio de gestación (Carmichael, 2004). El herpesvirus canino puede localizarse en los linfonodos nerviosos donde permanece latente, siendo reactivado y liberado esporádicamente luego de algún evento estresante, constituyendo una fuente de infección permanente para los animales susceptibles (Okuda *et al.*, 1993).

Epidemiología

El virus parece estar presente a nivel mundial en caninos domésticos y silvestres. Los animales seropositivos están por encima del 30% en estudios de campo. Algunos criaderos tienen prevalencias del 100% (Carmichael, 2004).

Patogénesis

En los cachorros de menos de 4 semanas se presentan signos que consisten en anorexia, disnea, dolor a la palpación abdominal, incoordinación y heces blandas amarillo verdosas. A veces ocurre descarga nasal serosa o hemorrágica. La temperatura rectal no está elevada y puede presentarse trombocitopenia en cachorros moribundos, hecho que ocurre luego de un período de incubación de 3 a 8 días. Al respecto, existen dos factores que predisponen a que en los cachorros caninos la infección con herpes virus sea generalmente fulminante: la temperatura óptima de la replicación viral (32-33 °C) coincide con la de los tractos genital y respiratorio alto, y a que los cachorros al nacer son relativamente inmaduros respecto de los centros termorreguladores hipotalámicos (Fenner *et al.*, 1992).

La replicación viral en adultos se restringe a las vías genitales, tonsilas, linfonodos retrofaríngeos y bronquiales, y ocasionalmente, a los pulmones. En cachorros recién

nacidos, la infección primaria se disemina por todo el organismo, siendo mortal en animales menores de cuatro semanas (Carmichael, 2004). Sin embargo, no se ha observado signos sugerentes de enfermedad en hembras que pierden camadas por CHV-1, la infección transplacentaria ocasiona abortos, partos prematuros o recién nacidos débiles (Carmichael, 2004).

En la traqueobronquitis infecciosa canina, el virus herpes canino participa desde su estado de latencia, siendo difícil determinar si se trata de un agente etiológico primario o bien, si es oportunista y se reactiva debido al estado de inmunosupresión del animal. Su importancia como agente etiológico en la signología clínica no está del todo determinado, aunque si se tiene en cuenta su estrecha relación con otros herpesvirus que producen signos respiratorios en sus huéspedes, no debe minimizarse entonces su participación en la enfermedad (Erles *et al.*, 2004).

En la forma ocular, la conjuntivitis puede ser considerada como manifestación de la enfermedad. La inflamación suele ser débil y autolimitante. Puede causar una enfermedad grave en el desarrollo del ojo del neonato. Displasia de retina y desprendimiento, retraso en la maduración, aparecen en cachorros infectados en el útero o durante el parto. La infección neonatal puede producir pannuveitis o retinitis tras la infección. También pueden aparecer cataratas, queratitis y sinequias (Ledbetter *et al.*, 2010).

Existe también reporte de presentación cutánea, presentando lesiones vesiculares, rodeadas de eritema y costras supurativas e inflamación de los linfonodos regionales (De Palma *et al.*, 2010).

Hallazgos a la necropsia e histopatología

A la necropsia se observan lesiones macroscópicas en las paredes de los vasos sanguíneos, grandes lesiones en riñones, pulmones, glándulas adrenales y tracto gastrointestinal. Se encuentran áreas de necrosis multifocal, hemorragias petequiales y equimóticas en varios órganos, incluyendo pulmón, hígado, riñón, bazo, cerebro e intestino. En riñones se observaron petequias y una apariencia de nuez moscada. Existe esplenomegalia, hepatomegalia, meningoencefalitis, congestión pulmonar y linfonodos

aumentados de tamaño (Figura 3) (Love y Huxtable 1976; Carmichael, 2004; Oliveira *et al.*, 2009).

En los estudios histopatológicos se encuentran áreas de necrosis multifocal, edema perivascular y hemorragias en órganos viscerales; en algunas laminillas se observan cuerpos de inclusión intranucleares, típicos de herpesvirus en las áreas necróticas, aunque pueden ser difíciles de encontrar, fibrina en los espacios aéreos de los pulmones, gliosis focal e infiltrado perivascular de linfocitos y macrófagos en cerebro (Love y Huxtable 1976; Carmichael, 2004; Oliveira *et al.*, 2009).

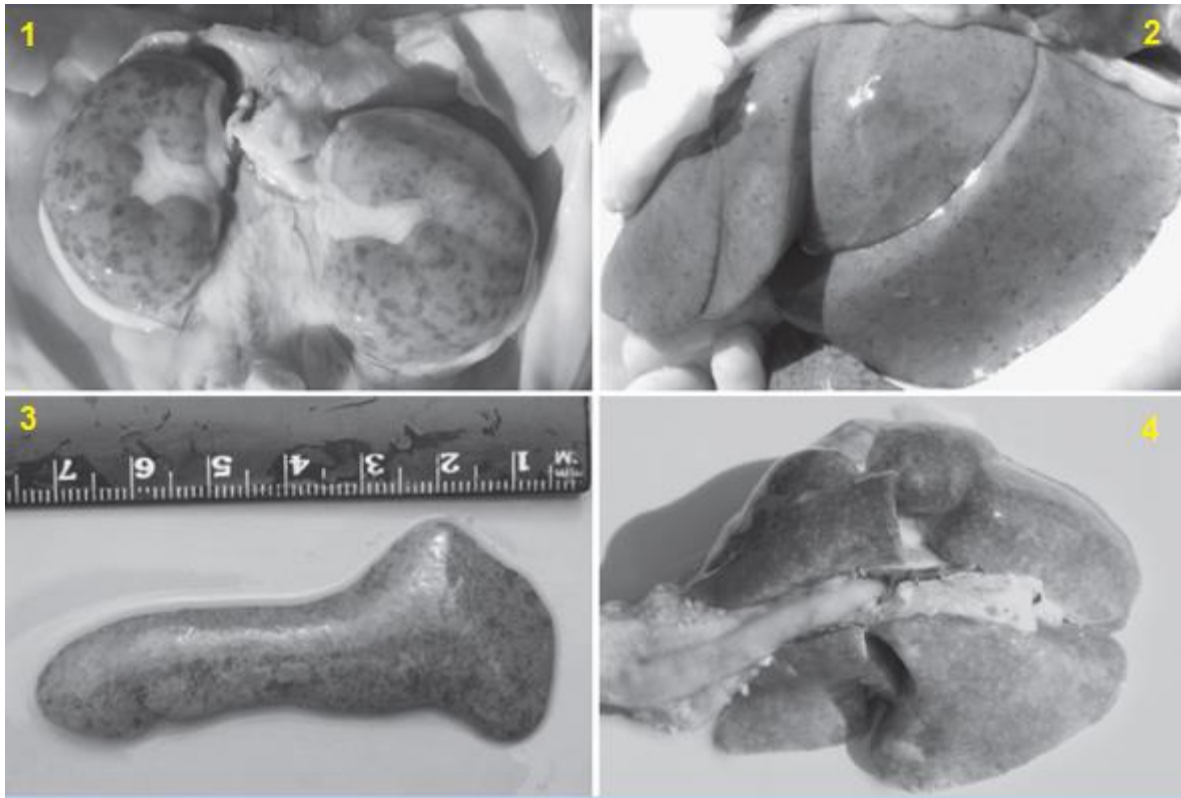


Figura 3. Hallazgos a la necropsia: 1) Riñones con múltiples focos hemorrágicos; 2) Hígado pálido con petequias; 3) Bazo aumentado de tamaño con múltiples focos hemorrágicos; 4) Pulmones con puntos blancos en la superficie pleural (Oliveira *et al.*, 2009).

Tratamiento

El tratamiento suele ser ineficaz debido al curso rápido de la enfermedad en cachorros. (Merk, 2000). Se ha reportado cierto éxito en cachorros expuestos tras la administración de vidarabine antes de la aparición de los signos. El tratamiento antiviral,

puede salvar la vida, aunque con secuelas en sistema nervioso central y corazón. Se puede prevenir la infección en cachorros expuestos inyectando 1 a 2 ml de suero de hembras afectadas. Aunque suele ser efectiva esta medida no es generalizada y no sirve si la enfermedad se desarrolla. El suero no está disponible comercialmente (Carmichael, 2004). En la manifestación cutánea de la enfermedad se puede administrar tratamiento con Aciclovir (De Palma *et al.*, 2006).

Medicina preventiva

Existe una vacuna inactivada con una subunidad del virus (Eurican Herpes 205, Merial Animal Health) disponible solo en Europa desde el 2003. La vacuna es específicamente indicada para hembras gestantes. Consiste en una glicoproteína purificada disuelta en aceite mineral. Provee de buena inmunidad a los cachorros después de 2 aplicaciones a la madre; una durante el celo o la gestación temprana y otra 1 o 2 semanas antes del parto. Está en desarrollo experimental otra vacuna de virus atenuado mutante (Carmichael, 2004).

Diagnóstico

La presencia del virus ha sido confirmada por aislamiento viral, inmunofluorescencia, seroneutralización, ELISA y PCR (De Palma *et al.*, 2006). Esta última representa hoy en día uno de los más específicos y sensibles métodos de diagnóstico del CHV. Es un método que detecta diminutas cantidades de secuencias de ADN, específicas de un organismo y las amplifica logarítmicamente de forma que pueden ser detectadas visualmente en el laboratorio. Un iniciador específico de ácido nucleico se hibrida con el material genético del microorganismo en cuestión, produciendo la amplificación de un fragmento corto de ADN específico a este organismo en particular. Para visualizarlo, los productos amplificados se someten a electroforesis para determinar el número de pares de bases. La PCR se puede utilizar para detectar a los portadores o animales con la enfermedad latente. Las muestras de riñón, hígado, bazo o pulmones y también torundas con muestras de cavidad oro-nasal pueden utilizarse para la PCR (Rodes, 2003).

Reacción en Cadena de la Polimerasa

La PCR abarca la síntesis específica y exponencial de una región predeterminada de ADN por medio del uso de dos pequeños fragmentos de ADN específicamente diseñados (iniciadores), que forman las dos terminales de la molécula de ácido nucleico que se va a amplificar. Las reacciones de amplificación por PCR son altamente específicas, la especificidad es determinada por la hibridación correcta de las secuencias específicas de los iniciadores complementando a las secuencias presentes en la molécula a amplificar en el ADN diana. Una vez hibridados al ADN destinado, los iniciadores proveen la doble cadena con terminación 3'-hydroxyl requerida por el ADN termoestable dependiente de ADN polimerasas para empezar la síntesis de una nueva cadena de ADN (Van Pelt-Verkuil, *et al.*, 2008).

Los iniciadores específicos son sintetizados químicamente, de modo que estos iniciadores son complementarios a las secuencias de ADN que flanquean la secuencia de interés. Uno de los cebadores es diseñado para alinearse a la hebra con sentido y el otro a la hebra sin sentido, con sus extremos 3' apuntándose el uno al otro. Los cebadores son mezclados con una solución tamponada que contiene el ADN molde, los dNTPs, magnesio y una enzima polimerasa termoestable. Los tubos de reacción con un plato termostable y se colocan en el interior de un bloque de calor programable. El ADN molde de doble hebra es entonces desnaturalizado por calor a una temperatura por encima de su punto de fusión. A continuación se descende la temperatura lo suficiente para que ocurra la hibridación entre los iniciadores y el ADN molde, pero que aún sea lo suficientemente alta para prevenir la hibridación errónea de los cebadores con otras secuencias de gran similitud que se encuentren en otras partes del genoma. El uso de altas concentraciones de cebadores favorece que esta reacción transcurra con mayor eficiencia que la de re-alineamiento de las hebras de ADN molde. Posteriormente, la temperatura es nuevamente incrementada para favorecer la actividad catalítica de la polimerasa. La cual se ha unido al extremo del dúplex molde – cebador. La síntesis comienza a partir de los extremos 3' hasta que la reacción es parada mediante un aumento de la temperatura hasta el punto de fusión por segunda vez. El producto de esta reacción de longitud indefinida y se conoce como “producto largo”. Así se completa el primer ciclo de la PCR. El segundo ciclo comienza con el paso de fusión,

seguido del alineamiento del iniciador. Esta vez, sin embargo, los cebadores no sólo hibridan con el ADN original sino también con las hebras que han sido sintetizadas en la primera reacción. Estas hebras poseerán la secuencia del iniciador que hizo posible la síntesis en el ciclo previo y se extenderán más allá del sitio de unión del otro cebador. El segundo ciclo repite el primero con respecto al ADN original, pero la síntesis sobre las nuevas hebras ocurrirá sólo hasta el final de la molécula, lo cual se corresponde con el extremo 5' del iniciador opuesto. Después de un tercer ciclo de PCR, es fácil ver que la síntesis dirigida por los productos de los primeros dos ciclos terminarán en los extremos definidos de ambos iniciadores y este tipo de producto se acumulará exponencialmente con subsiguientes ciclos. El "producto largo" continuará incrementándose en forma lineal. Por consiguiente, el producto mayoritario de una PCR será de una longitud definida, consistiendo en la secuencia entre los iniciadores y la propia secuencia de los iniciadores (Luque y Herraéz, 2001).

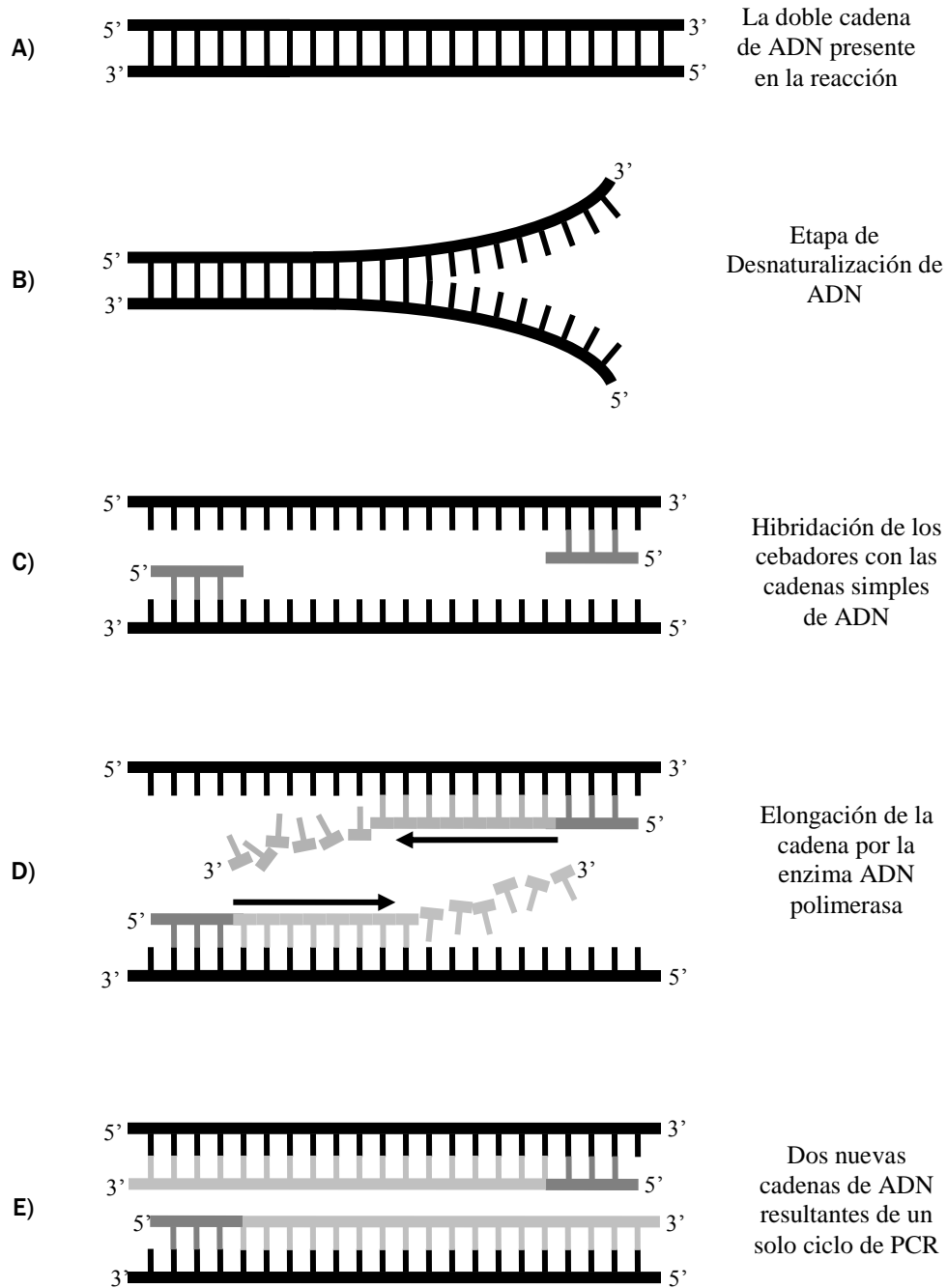


Figura 4. Representación de la reacción llevada a cabo por la PCR (Montiel *et al.*, 2011).

Esta reacción no es precisamente una técnica, sino una metodología en la que se aplican tres conceptos fundamentales:

- 1) Desnaturalización de la cadena doble de ADN, generalmente a temperaturas mayores de 68°C y menores de 97°C;

2) Hibridación de la hebra sencilla con un oligonucleótido, las temperaturas usuales están en un rango de 37 y 65°C que se mantienen entre 10 y 20 segundos, la temperatura de fusión o melting (T_m), se relaciona directamente con la desnaturalización y depende del contenido en pares de bases C≡G o A=T de la cadena de ADN. Mientras los pares de bases C≡G sean más abundantes que A=T, la temperatura de fusión aumentará debido a que la interacción en C≡G es más fuerte que A=T. Esto implica que, para que suceda la desnaturalización, la T_m deba ser rebasada y todas las interacciones logren romperse y viceversa, la temperatura de hibridación debe ser menor que la T_m para que las hebras puedan unirse por completo. La temperatura de fusión se calcula: $T_m = 4(\#G + \#C) + 2(\#A + \#T)$;

3) Replicación de las hebras sencillas de ADN por la acción de una ADN polimerasa a partir del oligonucleótido mencionado que se efectúa a una temperatura de 72°C (Montiel *et al.*, 2011).

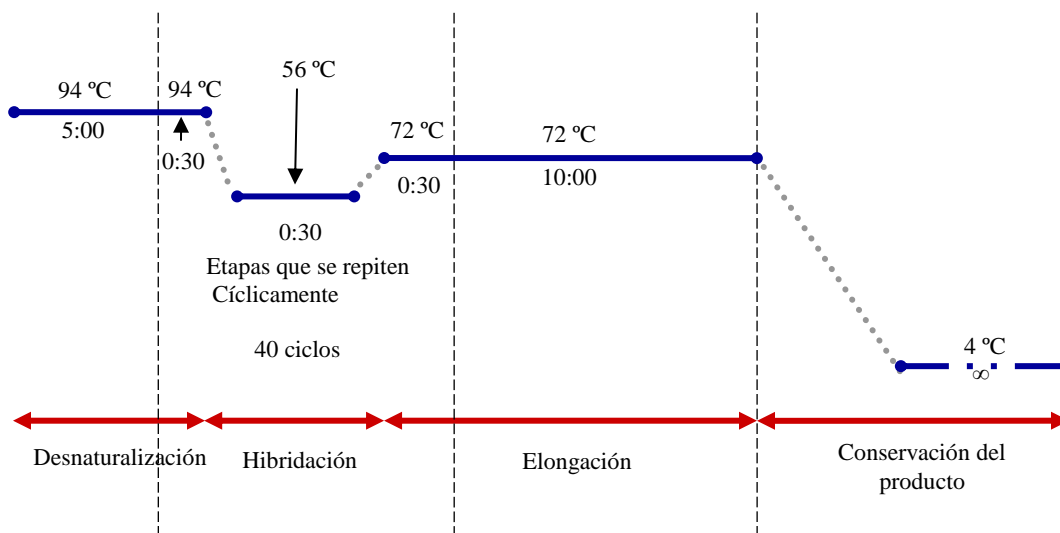


Figura 5. Diagrama del programa de amplificación optimizado empleado en este trabajo

ANTECEDENTES

El virus herpes canino tipo 1 (CHV-1) fue identificado por primera vez por Carmichael en 1965 y desde entonces ha sido estudiado por diferentes autores. La PCR ha sido utilizada para el diagnóstico del herpesvirus canino en diferentes países a partir de tejidos procedentes de caninos. Un estudio realizado en Alemania por Parzefall *et al.*, en el 2010 busco identificar el virus en el laberinto vestibular, ganglio vestibular y trigémino del perro. Otro estudio realizado en Alemania por Schulze y Baumgartner en 1998 con PCR anidada para el diagnóstico en cachorros muertos por la enfermedad. En Bélgica, Ronsse *et al.*, en el 2005, buscó el virus en secreciones nasales y vaginales por PCR. Burr *et al.*, en Inglaterra en 1996, realizó la PCR en tejidos de varios órganos de animales post-mortem. En Argentina, De palma *et al.* en el 2006, también utilizó la PCR para confirmar la presencia del virus en piel.

HIPÓTESIS

Las lesiones macro y microscópicas de cada muestra que sugieren un diagnóstico clínico de herpesvirus canino están relacionados a positividad mediante la técnica de PCR para el gen que codifica la glicoproteína B del virus.

OBJETIVO GENERAL

- Identificar la presencia del herpesvirus canino en muestras biológicas provenientes de necropsia de caninos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

Objetivos específicos

- Seleccionar animales remitidos a necropsia en aquellos que el diagnóstico morfológico e histopatológico sugiera infección por herpesvirus canino.
- Estandarizar un método para cuantificar ADN en extractos de tejidos para la PCR.
- Identificar la presencia del herpesvirus canino, empleando la PCR para detectar el gen de la Glicoproteína B a partir de tejidos afectados.

JUSTIFICACIÓN

En países de todo el mundo como Alemania (Parzefall *et al.*, 2011), Argentina (De Palma *et al.*, 2010), Bélgica (Ronsee *et al.*, 2005), Brasil, (Oliveira *et al.*, 2009), Chile (Navarro *et al.*, 2003), Estados Unidos (Maxson *et al.*, 2001), Holanda (Rijsewijk *et al.*, 1999), Italia (Decaro *et al.*, 2010), Japón (Tanaka *et al.*, 2003), Perú (Góngora *et al.*, 2007), Reino Unido (Burr *et al.*, 1996), Sudáfrica (Nöthling *et al.*, 2008), y Turquía (Yeşilbağ *et al.*, 2012), se ha confirmado la presencia del virus en la población canina. En México, no ha sido reportada la presencia del CHV-1 y no existen estudios documentados que lo demuestren, no obstante, hay muerte perinatal que de acuerdo a los signos son sugestivos de la presencia del virus y positivos a inmunofluorescencia (DIVET®, 2012). Esto genera un importante impacto económico para los criadores de perros al perder camadas completas, gastos de diagnóstico y costos de tratamiento inadecuado, por lo que es importante establecer métodos adecuados de diagnóstico.

MATERIALES Y MÉTODOS

I.- SELECCIÓN DE MUESTRAS

Todas las muestras fueron proporcionadas por el laboratorio DIVET® y corresponden con casos recibidos durante el año 2012. Se trabajaron 25 muestras de tejidos provenientes de 13 casos clínicos.

Criterios de inclusión:

1. Tejidos de animales conservados en congelación a una temperatura de -20°C . que en la necropsia se observó áreas necróticas y hemorragias multifocales en diferentes órganos como riñones, pulmones, intestino, cerebro y bazo. En riñones se observaron petequias y una apariencia de nuez moscada. Existió esplenomegalia, hepatomegalia, meningoencefalitis y congestión pulmonar.
2. Todo aquel tejido que al realizar el examen histopatológico, se encontraron áreas de necrosis multifocal, edema perivascular y hemorragias en órganos viscerales, a veces cuerpos de inclusión intranucleares. Fibrina en los espacios aéreos de los pulmones. Gliosis focal e infiltrado perivascular de linfocitos y macrófagos en cerebro. Meningitis con necrosis de las paredes vasculares.
3. Todos los tejidos de animales que fueron positivos en la prueba de inmunofluorescencia contra el herpesvirus canino. (Cuadro 1)

Criterios de exclusión

1. Tejidos de animales conservados solo en formol.

II.- IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para poder trabajar las muestras, se creó una base de datos que contiene el número de caso, fecha, edad, sexo, órgano seleccionado y el resultado de la inmunofluorescencia. (Cuadro 1). En la mayoría de los casos se trataba de un solo órgano, excepto en una

muestra que fue una mezcla de diferentes órganos debido a que se encontraban mezclados. También se les asignó un código para facilitar su manejo durante el estudio, este código contiene el número de caso, especie y el órgano (Cuadro 2). Se utilizó una muestra de humano positiva a herpes labial como control negativo. No se contó con un control positivo de herpes canino, debido a que no hay vacuna en México y no se ha documentado el aislamiento viral, se utilizó una muestra que fue positiva a inmufluorescencia contra el herpesvirus canino. Se utilizó un marcador de pares de bases de la marca Invitrogen (1 Kb DNA Ladder).

III.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

IIIa.- Extracción de ADN.

Una vez identificadas las muestras se realizó la extracción de ADN total a partir de diferentes tejidos utilizando el protocolo de Sambrook (Montiel, 2011). Este protocolo se basa en la disolución del tejido de la muestra usando detergentes y proteinasa, extracción de proteínas y polisacáridos con fenol, cloroformo y alcohol isoamilico, seguido de la precipitación de ADN con etanol frío.

A continuación se describe el protocolo completo.

Disgregación del tejido:

Se tomó 1 cm² congelada del tejido y se maceró en un mortero, el sobrenadante se colocó en un tubo donde se adicionó 1250µl de solución de lisis y se agitó con el vortex hasta que se visualizaron pedazos más pequeños. Se agregaron 7µl de enzima proteasa a una concentración de 20mg/ml y se incubaron los tubos a 50°C por 2 horas. Para inactivar la enzima se incrementó la temperatura a 60°C por una hora.

Extracción de proteínas y polisacáridos:

Se adicionó a cada tubo 0.25ml de la mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico y se homogenizó el tubo varias veces suavemente. Posteriormente, se centrifugó a 10,000rpm durante 10 minutos. Se separaron las fases y se recuperó la fase acuosa superior que contiene el ADN evitando recuperar cualquiera de las otras fases.

Precipitación de ADN:

Se adicionó 1500µl de etanol frio a los tubos con la fase acuosa, se mezcló suavemente y se centrifugó a 10,000 rpm, durante 10 minutos. Se decantó el etanol y se dejó secar a 37°C, el ADN se visualizó como una mancha blanca pegada al tubo. Una vez que el etanol ha sido eliminado, se adicionó agua libre de nucleasas para resuspender el ADN, se agitó suavemente el tubo hasta su completa disolución.

IIIb.- Cuantificación del ADN.

Para cuantificar la cantidad de ADN, se empleó un espectrofotómetro con emisión de luz UV utilizando celdas de 1 cm² y 800µl de volumen. Las lecturas se tomaron a 260 y 280 nm. Una unidad de densidad óptica corresponde a aprox. 50 µg/ml de DNA de doble hebra. La relación entre las lecturas a 260 y 280 nm proporciona un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos. Una relación inferior a 1.8 indica que pueden existir proteínas y/u otros elementos absorbentes de UV en la muestra. Una relación superior a 2.0 indica que las muestras pueden estar contaminadas con cloroformo o fenol. Para calcular la concentración de ADN se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{DO}_{260} \times (\text{factor de dilución}) \times 50.$$

(Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo “CIMMYT”, 2006)

Se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro y se estandarizó la técnica realizando diluciones con 2, 4, 6, 8, 10 y 40µl del extracto de una muestra en 800µl de agua desionizada teniendo distintos factores de dilución. Se realizó una curva de calibración midiendo la muestra a 230, 260 y 280 nm. Se obtuvo el coeficiente de correlación, para seleccionar la cantidad de extracto de muestra y la dilución más adecuada para cuantificar el ADN. Como solución patrón, se utilizó la misma muestra medida en un Nanodrop.

IIIc.- Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Para la realización de la PCR se eligieron los iniciadores previamente descritos, los cuales se muestran en el gen que codifica la glicoproteína B del CHV-1 (número de acceso del GenBank: AF361073.1). (Reubel, *et-al.*, 2002) (Fw P1: 5' CAG GAC TAT TGG ACT ATA GT 3', Rv P2: 5' TTG CAA TGC CCC TCA TAA TT 3') esperando un amplificado de 120 pb (pares de bases). (Burr *et al.*, 1996; Maxson *et al*, 2001; Melcher *et al.*, 2001; De Palma *et al.*, 2010)

La reacción de PCR se preparó en tubos de 25µl adicionando dNTP's, Taq polimerasa, buffer, MgCl₂, los iniciadores, ADN y agua libre de nucleasas (Cuadro 4). Se preparó la mezcla total y posteriormente fue agregada por a cada tubo de reacción y el ADN. Se utilizaron tubos blancos a los cuales se agregaron exactamente lo mismo que a los otros, excepto el ADN y se trabajaron bajo las mismas condiciones que las muestras.

Una vez preparadas las reacciones se introdujeron al termociclador utilizando como base el programa de amplificación descrito por Melcher *et al.*, 2001. Dado que no se obtuvieron resultados positivos con el protocolo descrito por el autor, se optó por estandarizar la técnica para este trabajo como se describe a continuación.

Desnaturalización:

Concentración de ADN: se utilizaron 5 concentraciones de prueba diferentes quedando de la siguiente manera: 165, 200, 240, 373 y 535 ng/ μ l el resto de las condiciones fueron las recomendadas por Melcher *et al.*, 2001.

Temperatura: se utilizaron 2 condiciones de temperatura diferentes de prueba, usando como base la recomendada por Melcher *et al.*, 2001, quedando de la siguiente manera 94°C por 5 minutos, seguido de 94°C por 1 minuto. Posteriormente se modificó a 94°C por 5 minutos, seguido de 94°C por 30 segundos.

Hibridación:

Concentración de iniciadores: se probaron 3 concentraciones incluyendo la recomendada por Melcher *et al.*, 2001 de 2 μ M, las otras de .5 μ M y 1 μ M el resto de las condiciones fueron las recomendadas.

Concentración de Buffer: se utilizó buffer a una concentración de 10x (Tris HCl pH 8.8) y el resto de las condiciones fueron las recomendadas por Melcher *et al.*, 2001.

Temperatura: se utilizaron 2 condiciones de temperatura diferentes de prueba, usando como base la recomendada por Melcher *et al.*, 2001, quedando de la siguiente manera 53°C por 1 minuto. Posteriormente se modificó a 56°C por 30 segundos.

Elongación:

Concentración de dNTP's: se utilizó como base la recomendada por Melcher *et al.*, 2001, de 200 μ M y el resto de las condiciones fueron las recomendadas.

Concentración de Mg: se utilizó como base la recomendada por Melcher *et al.*, 2001, de 2.5 mM y el resto de las condiciones fueron las recomendadas.

Concentración de Taq polimerasa: se utilizó como base la recomendada por Melcher *et al.*, 2001, de .04 u/ μ l y el resto de las condiciones fueron las recomendadas.

Temperatura: se utilizaron 2 condiciones de temperatura diferentes de prueba, usando como base la recomendada por Melcher *et al.*, 2001, quedando de la siguiente manera 72°C por 10 minutos, seguido de 72°C por 10 minutos. Posteriormente se modificó a 72°C por 30 segundos, seguido de 72°C por 10 minutos.

III.d.- Electroforesis en gel de agarosa.

Preparación del gel:

Se preparó el gel al 3%, para lo cual se pesó 1.5 g de agarosa y se agregó 50 ml de TAE 1X. La mezcla se calentó hasta que se disolvió. (Cuadro 4) Se dejó enfriar unos minutos sin que solidificara y se añadió el BrEt (3 μ l). Se adiciono TAE 1X a la cámara hasta cubrir el gel.

Carga y corrida del gel:

En un trozo de parafilm se situaron gotas de buffer de carga (4 μ l /2X), evitando incorporar burbujas dentro de la gota. Posteriormente se añadieron las gotas de

BrEt adjuntas a las gotas de colorante sin que se mezclen. Finalmente se colocó la muestra. Se mezcló una a una con los otros componentes, se recogió la mezcla y se depositó en el pocillo correspondiente. También se cargó el marcador de pares de bases de la marca Invitrogen (1 Kb DNA Ladder). Una vez terminado de cargar el gel, se conectó a la fuente de poder (~85V). La corrida continuó hasta que el colorante se visualice cerca del extremo contrario del gel.

Para visualizar el ADN se utilizó un transiluminador de luz UV.

Fotografía de gel de agarosa.

Las fotografías de los geles se tomaron utilizando una cámara especial para fotografiar geles teñidos con bromuro de etidio e iluminados con luz UV.

RESULTADOS

Se recopilaron los datos de los tejidos proporcionados por el laboratorio DIVET conteniendo el número de caso, fecha, edad, sexo y órgano seleccionado (Cuadro 1).

Cuadro 1. Datos de los perros, muestras utilizadas y resultados en la prueba de inmunofluorescencia, utilizados para identificar herpes canino.

Caso	Fecha	Edad	Sexo	Órgano o Fluido.	Resultado de IF.
1	14-01-12	4 días	Hembra	Hígado	+
2	31-01-12	3 años	Hembra	Encéfalo	ND
3	Sin fecha	8 meses	Macho	Cerebro	ND
				Hígado	ND
				Intestino	ND
4	22-02-12	22 días	Hembra	Hígado	ND
5	Sin identificar			Bilis	ND
				Pulmón	ND
				Bazo	ND
				Encéfalo	ND
6	14-10-12	3 días	Macho	Pulmón	ND
				Riñón	ND
				Bazo	ND
				Hígado	ND
				Encéfalo	ND
7	28-01-12	8 meses	Macho	Hígado	ND
8	27-01-12	21 días	Macho	Cerebro	ND
				Riñón	ND
				Hígado	ND
9	Sin fecha	2 años	Hembra	Piel	+
				Plasma	+
				Capa Flogística	+
10	22-09-12	2 meses	Hembra	Encéfalo	+
				Hígado	+
11	22-09-12	1 mes 20 días	Hembra	Cerebro	+
				Hígado	+
				Bazo	+
12	22-10-12	1 semana	Macho	Encéfalo	+
13	20-12-12	35 días	Macho	Mezcla de Órganos	ND

ND: No Determinado, IF: Resultado de la Inmunofluorescencia

Así mismo, se realizó la identificación de las muestras, asignándose un código que contiene el número de caso, especie y el órgano (Cuadro 2).

Cuadro 2. Identificación de las muestras utilizadas para la detección por PCR de herpesvirus canino.

Código	Muestra
C1H	Hígado
C2E	Encéfalo
C3C	Cerebro
C3H	Hígado
C3I	Intestino
C4H	Hígado
C5b	Bilis
C5P	Pulmón
C5B	Bazo
C5E	Encéfalo
C6P	Pulmón
C6R	Riñón
C6B	Bazo
C6H	Hígado
C6E	Encéfalo
C7H	Hígado
C8C	Cerebro
C8R	Riñón
C8H	Hígado
C9P	Piel
C9PL	Plasma
C9CF	Capa Flogística
C10E	Encéfalo
C10H	Hígado
C11C	Cerebro
C11H	Hígado
C11B	Bazo
C12E	Encéfalo
C13V	Mezcla Varios órganos
HP	Piel (Herpes Labial)

C=canino; H=humano; N°=número de caso y letra mayúscula el órgano. Ejemplo:C1H=Canino, caso 1, Hígado.

Las lecturas realizadas con el espectrofotómetro a 260 y 280 nm, permitieron establecer un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos y adicionalmente determinar la concentración de ADN (Cuadro 3) de las muestras de tejidos y fluidos.

Cuadro 3. Cálculo de la concentración y pureza de ADN de las muestras de Tejidos determinado por espectrofotometría.

Código	260 nm	280 nm	As 260/280	Concentración de ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
C1H	0.127	0.086	1.48	635
C2E	0.152	0.038	4.00	760
C3C	0.186	0.050	3.72	930
C3H	0.052	0.028	1.86	260
C3I	0.047	0.045	1.04	235
C4H	0.041	0.035	1.17	205
C5b	0.041	0.041	1.00	205
C5P	0.050	0.053	0.94	250
C5B	0.116	0.089	1.30	580
C5E	0.048	0.046	1.04	240
C6P	0.038	0.035	1.09	190
C6R	0.163	0.093	1.75	815
C6B	0.252	0.143	1.76	1260
C6H	0.030	0.031	0.97	150
C6E	0.050	0.050	1.00	250
C7H	0.039	0.036	1.08	195
C8C	0.107	0.074	1.45	535
C8R	0.125	0.085	1.47	625
C8H	0.203	0.120	1.69	1015
C9P	0.039	0.039	1.00	195
C9PL	0.058	0.064	0.91	290
C9CF	0.020	0.015	1.33	100
C10E	0.103	0.065	1.58	515
C10H	0.055	0.037	1.49	275
C11C	0.493	0.290	1.70	2465
C11H	0.109	0.067	1.63	545
C11B	0.525	0.308	1.70	2625
C12E	0.023	0.004	0.55	115
C13V	0.019	0.008	2.37	95
HP	0.029	0.007	4.14	145

Una relación inferior a 1.8 indica que pueden existir proteínas y/u otros elementos absorbentes de UV en la muestra; una relación superior a 2.0 indica que las muestras pueden estar contaminadas con cloroformo o fenol. (CIMMYT, 2006)

ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR

Después de utilizar el programa de amplificación descrito por Melcher y no obtener resultados, se modificaron las concentraciones de los reactivos (Cuadro 4), así como las temperaturas del protocolo hasta la estandarización de la técnica (Cuadro 5).

Cuadro 4. Concentración de reactivos para PCR optimizada en el presente trabajo.

Componente	Concentración	Volumen
Primer 1	2 mM	1 µl
Primer 2	2 mM	1 µl
dNTP's	200 µM	1 µl
Taq	0.04 u/µl	2 µl
Buffer	10X (TrisHCl)	2.5 µl
Mg	2.5 mM	3 µl
DNA	240 ng/ µl	5 µl
H ₂ O	La necesaria para completar 25 µl	

Las concentraciones y volúmenes obtenidos en la estandarización que mejor funcionaron, los cuales se utilizaron para correr todas las muestras

Cuadro 5. Programa de amplificación optimizado empleado en este trabajo

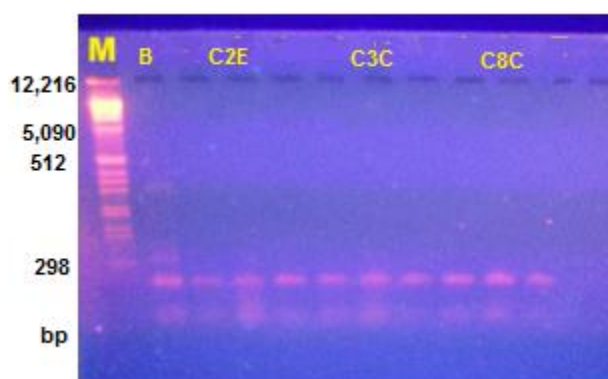
Temperatura	Tiempo
94°C	5 minutos
94°C	30 segundos
56°C	30 segundos
72°C	30 segundos
40 ciclos de las tres últimas etapas	
72°C	10 minutos

Las condiciones de temperatura y tiempo que mejor funcionaron en la estandarización, los cuales se utilizaron para procesar todas las muestras.

Posteriormente a la PCR se realizó la electroforesis en el gel de agarosa y se obtuvieron los siguientes resultados:

Los geles de la PCR 1, 3 y 4 no se muestran porque se apreciaron bandas poco definidas con barridos de diferente intensidad a lo largo de los carriles de corrimiento. El gel de la PCR 2 no se muestra debido a que no se observó amplificado. En el gel de la PCR 5 y 7, todos los carriles muestran una banda incluyendo el blanco, lo que indica contaminación. No se muestra el gel de la PCR 5, ya que es el mismo resultado que se obtuvo en la PCR 7 (Fig. 6).

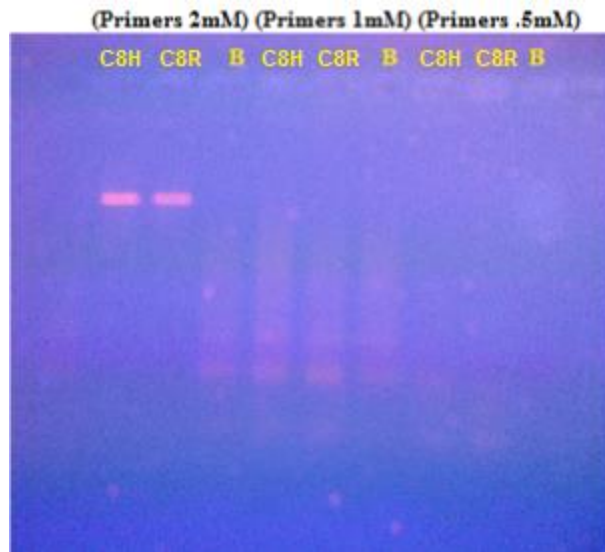
Fig.6 Fotografía del gel de agarosa al 3% de la PCR 7



En la figura 6 se observa la electroforesis realizada en un gel de agarosa al 3%, donde se muestra en el carril M el marcador de pares de bases, en el carril B un blanco (control negativo) que contiene agua en lugar de ADN, en el carril C2E una muestra del extracto de ADN de encéfalo del canino 2, en el carril C3C una muestra del extracto de ADN de cerebro del canino 3, en el carril C8C una muestra del extracto de ADN de cerebro del canino 8. En el gel realizado tras la modificación de las concentraciones de ADN, se observan amplificadas menores a 298 pares de bases de acuerdo al marcador de pares de bases, sin embargo se observa una banda en el carril B que nos indica contaminación.

Durante la estandarización de la técnica se observaron bandas bien definidas en los geles de las PCR 6, 8 y 9. Los geles 6 y 8 no se muestran, debido a que se obtuvieron resultados similares a los de la PCR 9 (Fig. 7)

Fig.7 Fotografía del gel de agarosa al 3% de la PCR 9.



En la figura 7 se observa la electroforesis realizada en un gel de agarosa al 3%, donde se muestra en los carriles B tres blancos (controles negativos) que contienen agua en lugar de ADN, en los carriles C8H una muestra del extracto de ADN de hígado del canino 8, en el carril C8R una muestra del extracto de ADN de riñón del canino 8. En el gel realizado tras la modificación de las concentraciones de iniciadores, se observan amplificados con bandas definidas en los carriles de las muestras C8H, C8R, a una concentración de 2 mM.

PCR ESTANDARIZADA

Tras estandarizar la técnica se incluyeron todas las muestras, obteniendo una banda entre los 285 y 292 bp en 25 de las 29 muestras de tejido y en 12 de los 13 casos sugerentes de CHV como se muestra en el cuadro 6.

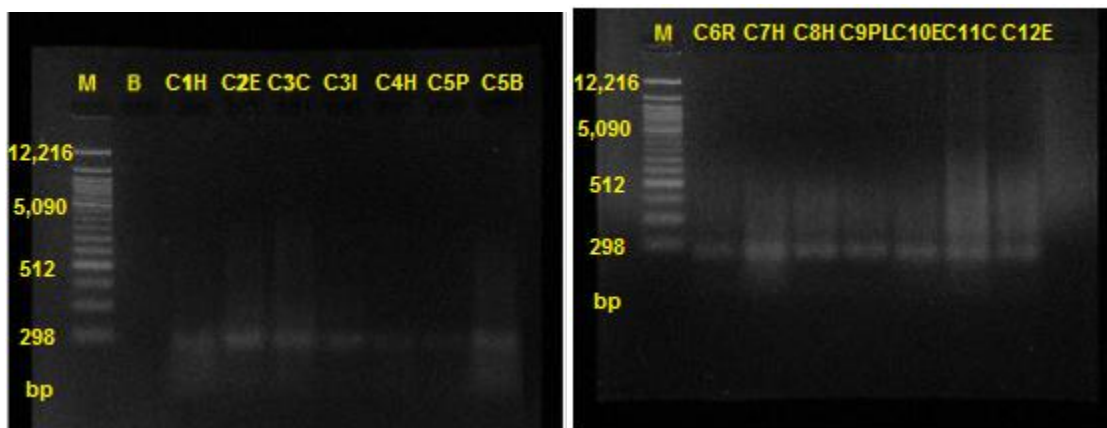
Cuadro 6. Resultado de la PCR 10 estandarizada con todas las muestras.

Caso	No. de muestra	Órgano	Banda entre 285 y 292 kp
1	C1H	Hígado	SI
2	C2E	Encéfalo	SI
3	C3C	Cerebro	SI
	C3H	Hígado	SI
	C3I	Intestino	SI
4	C4H	Hígado	SI
5	C5b	Bilis	NO
	C5P	Pulmón	SI
	C5B	Bazo	SI
	C5E	Encéfalo	NO
6	C6P	Pulmón	SI
	C6R	Riñón	SI
	C6B	Bazo	SI
	C6H	Hígado	SI
	C6E	Encéfalo	NO
7	C7H	Hígado	SI
8	C8C	Cerebro	SI
	C8R	Riñón	SI
	C8H	Hígado	SI
9	C9P	Piel	SI
	C9PL	Plasma	SI
	C9CF	Capa Flogística	SI
10	C10E	Encéfalo	SI
	C10H	Hígado	SI
11	C11C	Cerebro	SI
	C11H	Hígado	SI
	C11B	Bazo	SI
12	C12E	Encéfalo	SI
13	C13V	Pug	NO
	HP	Piel	NO
	B	Blanco	NO
	B	Blanco	NO

En la mayoría de las muestras se observó un amplificado entre 285 y 292 pb. Las muestras que están resaltadas son los que se colocaron en un segundo gel con el fin de documentar los resultados.

Con el fin de foto documentar los resultados, se seleccionó una muestra de tejido de cada caso positivo y se realizó una nueva electroforesis en gel de agarosa, observando nuevamente amplificados con bandas definidas entre 285 y 292 pb.

Fig.8 Fotografía del gel de agarosa al 3% de la PCR 10.



En este último gel se observa que en todos los carriles de las muestras se encuentra un amplificado a la misma altura que de acuerdo al marcador de peso molecular Invitrogen (1 Kb DNA Ladder) es menor de 298 bp.

En la figura 8 se observa la electroforesis realizada en un gel de agarosa al 3%, donde se muestra en el carril M el marcador de pares de bases, en el carril C1H una muestra del extracto de ADN de hígado del canino 1, en el carril C2E una muestra del extracto de ADN de encéfalo del canino 2, en el carril C3C una muestra del extracto de ADN de cerebro del canino 3, en el carril C3I una muestra del extracto de ADN de intestino del canino 3, en el carril C4H una muestra del extracto de ADN de hígado del canino 4, en el carril C5P una muestra del extracto de ADN de pulmón del canino 5, en el carril C5B una muestra del extracto de ADN de bazo del canino 5, en el carril C6R una muestra del extracto de ADN de riñón del canino 6, en el carril C7H una muestra del extracto de ADN de hígado del canino 7, en el carril C8H una muestra del extracto de ADN de hígado del canino 8, en el carril C9PL una muestra del extracto de ADN de plasma del canino 9, en el carril C10E una muestra del extracto de ADN de encéfalo del canino 10, en el carril C11C una muestra del extracto de ADN de cerebro del canino 11, en el carril C12E una muestra del extracto de ADN de encéfalo del canino 12. En este gel se observa que en todos los carriles de las muestras se encuentra un amplificado a la misma altura que de acuerdo al marcador utilizado es menor de 298 bp, lo que nos indica que existe ADN delimitado por los primers y amplificado por PCR.

CÁLCULO DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PCR CONTRA EL DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO E INMUNOFLUORESCENCIA.

Las fórmulas empleadas para calcular la sensibilidad y la especificidad fueron:

$$Sensibilidad = \frac{VP}{VP + FN} \quad Especificidad = \frac{VN}{VN + FP}$$

(Argente *et al*, 2008)

Cuadro 7. Sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR contra el diagnóstico histopatológico en animales de 2 meses de edad o menores

PCR/Histopatológico	+	-
+	7	0
-	0	1

$$Sensibilidad = \frac{VP}{VP + FN} \quad 7/(7+0)=1$$

$$Especificidad = \frac{VN}{VN + FP} \quad 1/(1+0)=1$$

Cuadro 8. Sensibilidad y Especificidad de la técnica de PCR contra el diagnóstico histopatológico en los animales utilizados en este trabajo.

PCR/Histopatológico	+	-
+	12	0
-	0	1

$$Sensibilidad = \frac{VP}{VP + FN} \quad 12/(12+0)=1$$

$$Especificidad = \frac{VN}{VN + FP} \quad 1/(1+0)=1$$

Cuadro 9. Sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR contra la inmunofluorescencia de los 5 animales en los que se realizó la prueba de IF.

PCR/Inmunofluorescencia	+	-
+	5	0
-	0	0

$$Sensibilidad = \frac{VP}{VP + FN} \quad 5/(5+0)=1$$

$$Especificidad = \frac{VN}{VN + FP} \quad 5/(5+0)=1$$

DISCUSIÓN

El presente estudio fue dirigido hacia muestras de animales remitidos a necropsia a el laboratorio particular DIVET® en las cuales se observaron lesiones que son sugerentes de infección por herpes virus así como en el estudio histopatológico de acuerdo a lo citado por Carmichael (2004) y Oliveira *et al.*, (2009).

Se tuvo acceso a la base de datos del laboratorio de diagnóstico DIVET® (Divet, 2012), cuantificando un total de 30 casos de caninos menores de 3 meses de edad y un feto remitidos a necropsia en el periodo comprendido del 1 enero del 2012 al 31 de diciembre del 2012.

De estos 30 (100%) casos de animales menores de 3 meses, tras la necropsia, 10 (33.3%) casos fueron sugerentes de la presencia de un herpes virus, al presentar las lesiones antes descritas por Carmichael (2004) y Oliveira *et al.* (2009), además de ser una infección que se presenta con frecuencia en animales menores de 3 meses. De los 10 casos sugerentes de infección de herpes virus en animales menores de 3 meses, se estudiaron 8 (100%) casos en este experimento, observando en un amplificado entre 285 y 292 pares de bases en 7 (87.5%) de los 8 casos. Este dato es indicativo de que el examen histopatológico realizado en el laboratorio, tiene una certeza mayor a 85% comparado con técnicas con alta sensibilidad como la PCR y ELISA, por lo que el examen histopatológico es una herramienta diagnostica eficaz, accesible y económica, cuando se sospecha de infecciones por herpesvirus canino.

Además de los 8 casos de animales menores de 3 meses de edad, se evaluaron tejidos de 2 animales de 8 meses de edad, de un animal sin identificar y de 2 adultos (uno de 3 años de edad remitido a necropsia y otro de 2 años de edad con signología cutánea.

El resultado del examen histopatológico reportado por el laboratorio DIVET de las muestras que amplificaron una banda de 285 a 292 pares de bases en la PCR en animales menores de 3 meses se muestra en el cuadro 7.

Como podemos observar en hígado existe una alta relación con degeneración albuminosa difusa severa y congestión difusa severa. En encéfalo se encuentra una alta relación con congestión difusa moderada y encefalitis no supurativa difusa severa.

Para realizar la PCR, se realizó la extracción del ADN total a partir de tejido por el protocolo clásico de Sambrook *J et al.*, 2001. Este protocolo se basa en la disolución del tejido de la muestra usando detergentes y proteínasa, extracción de proteínas y polisacáridos con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico, seguido de la precipitación de ADN con etanol frío, mismo protocolo utilizado por Montiel *et al.*, 2011. Corroborándose que fue útil para el presente trabajo obteniendo concentraciones adecuadas de ADN en las muestras para PCR, no obstante presentaron una relación inferior a 1.8, lo que indicaría que pueden existir proteínas en las muestras de ADN y 4 muestras tuvieron valores mayores a 2, lo que indicaría contaminación con cloroformo o fenol (Cuadro 3).

Para cuantificar la cantidad de ADN, se comparó el uso de un Nanodrop el cual es un equipo automatizado de espectrofotometría que determina la concentración de ADN con 1 μ l de muestra sin diluir y que realiza los cálculos automáticamente. Por otro lado se empleó un espectrofotómetro con emisión de luz UV utilizando, el método descrito por el CIMMYT (2006), midiendo a 230, 260 y 280 nm con 2, 4, 6, 8, 10, 20 y 40 μ l de muestra diluidos en 800 μ l de agua desionizada, Como patrón se utilizó una muestra medida previamente en el nanodrop para así poder determinar la curva de calibración en el espectrofotómetro mediante una curva y coeficiente de correlación. Se obtuvieron los mejores resultados con 8, 10 y 20 μ l. de muestra en 800 μ l de agua desionizada, mediante un coeficiente de correlación de absorbancia a 230 y 260 nm. Una vez estandarizado el proceso de medición con el espectrofotómetro se midieron todas las muestras con 8 μ l cada una y con ayuda de la fórmula tomada del libro *Protocolos de Laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT* se determinó la concentración de ADN de cada muestra. De esta manera se verificó que se podía utilizar el espectrofotómetro de luz UV para realizar las mediciones de concentración de ADN de las muestras de manera segura con un rango de error menor de 5%.

La PCR ha sido utilizada para el diagnóstico del herpesvirus canino en diferentes países. Un estudio realizado en Alemania por Parzefall et al, 2010 nos muestra que de 52 animales estudiados post-mortem desde 3 días de nacidos hasta los 15 años, encontraron que el 17% (tejido: laberinto vestibular) fueron positivos para PCR amplificando un fragmento de ADN de 450 bp del gen que codifica la glicoproteína B y 19% (tejido: ganglio vestibular) fueron los animales de entre 17 días de edad y 13 años. El 12% (tejido: ganglio trigémino) fueron positivos para CHV.

En otro experimento realizado en Bélgica por Ronsse et al, 2005 se utilizaron hisopos nasales y vaginales de 27 hembras con alguna monta o no en su vida, pertenecientes a 13 criaderos distintos. El resultado de la PCR fue negativo en todos los animales, esperando un amplificado de 450 pb del gen que codifica la glicoproteína B. Sin embargo sus controles positivos derivados de un cultivo celular fueron positivos y la historia clínica de los animales con abortos y alta mortalidad en las camadas era sugestiva de la infección por herpes canino, así como, títulos de anticuerpos elevados en ELISA, sugieren los autores que el resultado negativo de la PCR se debe interpretar con cuidado para estudios de campo y a la dificultad de aislar el virus de los animales en periodo de latencia aunque tengan lesiones recientes.

En un experimento realizado en Alemania por Schulze y Baumgartner, 1998 con PCR anidada donde se obtuvieron amplificados de 168 bp del gen que codifica la timidina quinasa para 7 cachorros muertos aparentemente por CHV, todos fueron positivos en la PCR en distintos órganos como riñón, hígado, pulmón, bazo y cerebro; siendo una herramienta útil en el diagnóstico de la enfermedad en su fase lítica cuando existe replicación viral y el gen se expresa en las células infectadas encontrando grandes cantidades de ADN viral.

Otro experimento realizado en Inglaterra por Burr et al, 1996 se obtuvieron extractos de tejidos de 12 animales post-mortem de más de 8 años de edad sacrificados por diversas razones como la edad, falla renal o hepática, así como neoplasias. Utilizaron dos

pares de primers para comparar uno realizado por ellos y uno convencional que es el mismo utilizado en este trabajo, esperando un amplificado de 120 pb del gen que codifica la glicoproteína B. De los 12 perros, 9 fueron positivos en la PCR en varios órganos.

En todos los experimentos mencionados, se trata de animales con una historia clínica, sugerente de la presencia del virus, ya sea en animales adultos o cachorros. La mayoría de los autores sugieren una alta prevalencia del virus en la población canina en animales adultos y una alta mortalidad en cachorros. En este trabajo al analizar la base de datos del laboratorio DIVET, se encontró que la enfermedad de herpes canino pudiera presentarse con frecuencia en animales menores de 3 meses de edad. También destacan la dificultad de obtener resultados con la PCR como herramienta diagnóstica en animales que no tengan una viremia persistente como en el caso cachorros. Esto también se pudo constatar, ya que a pesar de ser un estudio dirigido a animales con viremia como es el caso de los cachorros, hay órganos afectados donde no se obtuvieron amplificadas.

Para la detección de herpes virus se realizó la técnica de PCR punto final bajo las condiciones utilizadas por Melcher *et al.* (2001), esta PCR amplifica una región dentro del gen que codifica la glicoproteína B del CHV-1 (código de acceso del GenBank: AF361073.1). No se obtuvieron amplificadas con la técnica descrita, por lo que se decidió modificar las condiciones y estandarizar la técnica.

Se modificó la concentración de Mg, ya que todas las ADN polimerasas termoestables requieren de cationes divalentes libres para su actividad excediendo la concentración molar de los grupos fosfato que aportan los dNTPs más los iniciadores, como lo menciona Montiel *et al.*, (2011). En la PCR que se modificó el Mg y la cantidad de Buffer, el gel se visualizó sin bandas. Se modificó la cantidad de dNTP's para no sobresaturar la enzima ya que son el sustrato y los componentes de las copias del fragmento diana. En la PCR en que se disminuyó la cantidad de dNTP's, todos los carriles mostraron una banda. Se realizó un barrido de concentraciones de los iniciadores, para seleccionar la mejor opción, debido a que las concentraciones altas de primer pueden promover la unión inespecífica de primers a secuencias parcialmente complementarias

presentes en el DNA de la muestra (mispriming) y acumulación de producto no específico incrementando la probabilidad de generar un templado independiente llamado dímero de primer. Los productos no específicos y los dímeros de primers son por si mismos sustratos para PCR y compiten con el producto deseado por la enzima, dNTPs e iniciadores, resultando en un bajo rendimiento del producto deseado. Se probaron 3 concentraciones de iniciadores .5, 1 y 2 mM, siendo la de 2 mM en la cual se obtuvieron amplificadores. Se realizó un barrido de concentraciones de ADN para encontrar la concentración óptima para la reacción, ya que si la concentración de ADN es menor, es probable que no se visualice una banda clara en un gel de agarosa, por otro lado, si la concentración es muy alta, la ADN polimerasa probablemente no podrá actuar sobre las cadenas desnaturalizadas de ADN. Se seleccionó una concentración final de 240 ng/ μ l, agregando 5 μ l por reacción. Al modificar lo anterior se obtuvieron amplificadores con bandas tenues, por lo que se decidió revisar las temperaturas de la reacción encontrando que la temperatura de fusión durante la hibridación se encontraba por debajo de lo requerido, ya que esta temperatura depende del contenido en pares de bases de los iniciadores C \equiv G o A=T de la cadena de ADN. Mientras los pares de bases C \equiv G sean más abundantes que A=T, la temperatura de fusión aumentará debido a que la interacción en C \equiv G es más fuerte que A=T. Esto implica que, para que suceda la desnaturalización, la temperatura de fusión deba ser rebasada y todas las interacciones logren romperse y viceversa.

Al obtener amplificadores claros con las modificaciones anteriores en dos ocasiones, la PCR fue estandarizada y realizó otra PCR donde se agregó un control negativo con un extracto de herpes labial humano. En el gel de la PCR se observaron barridos a lo largo de todos los carriles menos el blanco y bandas definidas en 25 carriles de las 29 muestras de perro, mientras que en la de humano y los dos blancos no se observaron bandas (Cuadro 6). Con el fin de documentar los resultados, de todas las muestras que amplificaron se seleccionó una de cada animal para correr otro gel al cual se agregó el marcador de peso molecular. En todos los carriles de las muestras se observó un amplificado a la misma altura que de acuerdo al marcador de peso molecular está entre los 285 y 292 bp. Las bandas observadas en el gel no son del peso molecular descrito de 120 bp (De Palma *et al.*, 2010; Maxson *et al.*, 2001; Melcher *et al.*, 2001; Burr *et al.*, 1996). Sin embargo los

amplificados obtenidos pueden ser producto del ADN buscado. La obtención de bandas de diferente peso molecular al esperado, se podría deber a las modificaciones del protocolo inicial, si la temperatura de templado es muy baja se pueden producir falsos positivos debidos fundamentalmente a apareamientos imperfectos del cebador con secuencias distintas a la diana, aunque similares, que resultan así también amplificadas (Luque y Herraéz, 2001). La utilización de un control negativo como en otros estudios de un perro sano hubiese evidenciado de manera más precisa la presencia de ADN viral tras la realización de la PCR, los amplificados obtenidos, podrían tratarse de pseudogenes que corresponden a copias de un gen que carece normalmente de intrones y de otras secuencias necesarias para la expresión; aunque son genéticamente similares al gen funcional original, no se expresan y frecuentemente contienen numerosas mutaciones (Roche, 2014) en caso de que esto suceda en herpesvirus. También la secuenciación genómica del fragmento amplificado habría sido de utilidad para identificar si el ADN perteneciera a un herpesvirus canino con cierta variación en el gen que codifica para la glicoproteína B.

Con base en los resultados obtenidos por PCR se determinó la sensibilidad de la prueba contra el diagnóstico histopatológico en animales de 2 meses de edad o menores, así como en todos los casos utilizados en el estudio y también contra el resultado de la inmunofluorescencia en los 5 casos donde se realizó. Se obtuvo un resultado de 100% en la sensibilidad y 100% en la especificidad de la PCR contra el resultado del estudio histopatológico y la inmunofluorescencia.

Cabe destacar que una de las muestras de los animales que se trabajó, era de un perro adulto de 2 años de edad con manifestaciones cutáneas, que de acuerdo a la inmunofluorescencia se diagnostica como herpesvirus, las lesiones se trataron con Aciclovir (Valdivia *et al.*, 2013). Existe un antecedente de otro perro en Argentina (De Palma *et al.*, 2010) donde se confirmó la presencia del virus en piel con aislamiento e inmunofluorescencia, siendo una presentación atípica del virus o que esté presente en padecimientos de la piel y sea mal diagnosticado.

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron amplificadores de un producto entre 285 a 292 pb, en 12 de las 13 muestras de animales que de acuerdo al diagnóstico morfo-patológico e histopatológico sugirieron infección por herpesvirus canino. Para fines de este trabajo, el diagnóstico histopatológico y la inmunofluorescencia confirman la presencia del herpesvirus canino en México.
- Siete (87.5%), de los 8 (100%) casos trabajados resultaron positivos con producto de amplificación en la PCR, en al menos uno de los órganos trabajados.
- En los 7 casos de cachorros de 2 meses de edad o menores positivos en la PCR con productos entre 285 y 292 pb. El hígado mostró una alta relación con degeneración albuminosa difusa severa y congestión difusa severa. En encéfalo se encontró una alta relación con congestión difusa moderada y encefalitis no supurativa difusa severa.
- El examen histopatológico previamente realizado en el laboratorio DIVET, tuvo una certeza mayor a 85% comparado con técnicas con alta sensibilidad como la prueba de PCR.
- La PCR demostró ser altamente sensible (100 %) y específica (100 %) cuando se compararon contra los resultados de histopatología y la fluorescencia realizados al mismo tiempo en las mismas muestras.

RECOMENDACIONES

- Los resultados de la PCR en un amplificado de mayor tamaño que el esperado pueden ser corroborados al realizar el aislamiento viral de las muestras.
- El aislamiento a partir de las muestras permitiría contar con un control positivo, debido a que esta enfermedad actualmente no está reconocida en México (SAGARPA-SENASICA) y por ello es imposible importar el virus en cualquier forma para poder usarlo como control positivo.
- Se sugiere emplear otro gen para amplificar, como el reportado y empleado mundialmente contra la polimerasa del herpesvirus y que amplifica contra cualquier herpesvirus (VanDevanter *et al.*, 1996).
- Es necesario secuenciar el producto amplificado de 285 a 292 pb obtenido por PCR para corroborar que estos productos están relacionados con herpesvirus canino.
- Se sugiere utilizar marcadores de tamaño molecular que se encuentren en el rango del producto esperado.

GLOSARIO

Bicatenario: Un virus ADN bicatenario (o virus dsDNA) es un virus en el que su material genético está compuesto por ADN de doble cadena y se replica usando una ADN polimerasa dependiente del ADN, no usando el ARN como intermediario durante la replicación.

Buffer: sistema constituido por un ácido débil y su base conjugada, o por una base y su ácido conjugado que tiene capacidad tamponante, es decir, que puede oponerse a grandes cambios de pH (en un margen concreto) en una disolución acuosa.

Cápside: estructura vírica proteica formada por una serie de monómeros llamados capsómeros.

Capsómeros: de latín *capsa* que significa caja y *Meros* que significa parte) son las subunidades básicas de la cápside, una cubierta exterior de la proteína que protege el material genético de un virus.

Citopático: Se denomina efecto citopático (ECP) a los cambios bioquímicos y moleculares, morfológicos y de viabilidad celular, visibles a microscopía óptica, causados durante el ciclo de replicación viral.

Desnaturalización: cambio estructural de las proteínas o ácidos nucleicos, donde pierden su estructura nativa, y de esta forma su óptimo funcionamiento y a veces también cambian sus propiedades físico-químicas.

Electroforesis: técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico.

Espectrofotómetro: instrumento usado en el análisis químico que sirve para medir, en función de la longitud de onda, la relación entre valores de una misma magnitud fotométrica relativos a dos haces de radiaciones y la concentración o reacciones químicas que se miden en una muestra.

Episoma: unidad extracromosómica replicante que funciona autónomamente o con un cromosoma también llamado unidad Eva. Puede integrarse, en muchos casos mediante un proceso de recombinación, en un cromosoma del organismo que lo porta. Los episomas más conocidos son los plásmidos.

Espículas: En algunos virus icosaédricos aparecen púas o espículas, que son estructuras de fijación a la célula hospedadora, estructuras de anclaje.

Esplenomegalia: agrandamiento patológico del bazo o estructura esplénica más allá de sus dimensiones normales

Glicoproteína: molécula compuesta por una proteína unida a uno o varios glúcidos, simples o compuestos. Destacan entre otras funciones la estructural y el reconocimiento celular cuando están presentes en la superficie de las membranas plasmáticas (glucocálix).

Gliosis: término médico usado para describir una proliferación de astrocitos en regiones lesionadas del sistema nervioso central (SNC) y que por lo general deja como saldo la formación de una cicatriz glial.

Hepatomegalia: aumento patológico del tamaño del hígado.

Hibridación: proceso de unir dos hebras complementarias de ADN.

Iniciador: También conocido como partidor, cebador o *primer*, es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN. Es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3'hidroxilo libre que forma pares de bases complementarios a una hebra molde y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde.

Meningoencefalitis: infección o una inflamación de las meninges y del cerebro.

Nanodrop: Es un espectrofotómetro que cuantifica y analiza soluciones en volúmenes de .5 a 2 ml sin diluciones en menos de 5 segundos.

Nucleasa: enzima hidrolasa del tipo esterasa que degradan ácidos nucleicos.

Parafilm: lámina de material semitransparente, flexible y resistente al agua que se utiliza como barrera contra la humedad de los instrumentos o equipos para el cuidado de la salud.

Petequias: lesiones pequeñas de color rojo, formadas por extravasación de un número pequeño de eritrocitos cuando se daña un capilar.

Polimerasa: enzima capaz de transcribir o replicar ácidos nucleicos.

Polipéptidos: del griego πολύς "mucho" y πεπτός "digerido", es utilizado para designar un péptido de tamaño suficientemente grande; como orientación, se puede hablar de más de 10 aminoácidos.

Polisacáridos: biomoléculas formadas por la unión de una gran cantidad de monosacáridos. Se encuentran entre los glúcidos, y cumplen funciones diversas, sobre todo de reservas energéticas y estructurales

Proteinasa: son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas. Usan una molécula de agua para hacerlo y por lo tanto se clasifican como hidrolasas.

Taq polimerasa: es un tipo de ADN polimerasa termoestable, nombrada de esta forma debido a que es producida por la bacteria *Thermus aquaticus* (T-aq) y a partir de la cual fue aislada en el año 1968 por Thomas D. Brock. A menudo suele abreviarse como "Taq Pol" (o simplemente como "Taq"), y es frecuentemente utilizada en las técnicas de PCR, un método que se utiliza para amplificar secuencias cortas de ADN.

Termociclador: también conocido como máquina de PCR o reciclador térmico de PCR es un aparato usado en Biología Molecular que permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para una reacción en cadena de la polimerasa de amplificación de ADN o para reacciones de secuencia con el método de Sanger.

Trombocitopenia: es cualquier situación de disminución de la cantidad de plaquetascirculantes en el torrente sanguíneo por debajo de los niveles normales

Vortex: Un agitador tipo vórtex o mezclador de vórtice es un dispositivo simple que se usa comúnmente en los laboratorios para agitar pequeños tubos o frascos de líquido.

BIBLIOGRAFÍA

1. Argente HA y Álvarez ME. Semiología Médica: Fisiopatología, Semiotecnia y Propedéutica: Enseñanza basada en el paciente. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2008: 19-21.
2. Boehmer P, Lehman I. Herpes simplex virus DNA replication. *Ann Rev Biochem* 1997; 66: 347-384.
3. Burr PD, Campbell MEM, Nicolson L, Onions DE. Detection of canine herpesvirus 1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* 1996; 53: 227-237.
4. Carmichael L. Neonatal viral infections of pups: Canine herpesvirus and minute virus of canines (canine parvovirus-1). International Veterinary Information Service [A0102.0899]. 2004 Aug [cited 2012 Mar 6]; Recent Advances in Canine Infectious Diseases. Available from: http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/carmichael/chapter_frm.asp
5. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. Tercera edición. México, D.F.: CIMMYT. 2006:11.
6. Decaro N, Amorisco F, Desario C, Lorusso E, Camero M, Bellacicco AL, Sciarretta R, Lucente MS, Martella V, Buonavoglia C. Development and validation of a real-time PCR assay for specific and sensitive detection of canid herpesvirus 1. *Journal of Virological Methods* 2010; 169: 176-180.
7. De Palma VE, Ayala MA, Gobello C, Echeverria MG, Galosi CM. An atypical clinical presentation for the first isolation of canid herpesvirus 1 in Argentina. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2010; 62 (5): 1267-1270.

8. DIVET®, Archivos electrónicos, año 2012, Especialidades en Diagnóstico SA de CV, Laboratorio DIVETc, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México.
9. Erles K, Dubovi, EJ, Brooks HW, Brownlie J. Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease J Clin Microbiol 2004; 42 (10): 4524-4529.
10. Fenner F, Bachmann PA, Gibbs EP, Murphy FA, Studert MJ. Virología veterinaria. España: Acribia, 1992: 349-386.
11. Góngora VA, Sandoval NC, Manchego AS, Evidencia serológica de la presencia del virus herpes canino tipo 1 en la provincia de Lima. Rev Inv Vet Perú 2007; 18 (2): 154-157.
12. ICTVdb. Reports of the International Committee on Taxonomy of Viruses. (2005). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ictvdb/ictv.->
13. Ledbetter EC, Kice NC, Matusow RB, Dubovi EJ, Kim SG. The effect of topical ocular corticosteroid administration in dogs with experimentally induced latent canine herpesvirus-1 infection. Experimental Eye Research 2010; 90 (1): 711-717.
14. Love D, E Huxtable. 1976. Naturally-occurring neonatal canine herpesvirus infection. Vet Rec 99, 501-503.
15. Luque J y Herraéz A. Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética: Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud. Madrid: Harcourt, 2001: 54-57.
16. Maxson TR, Meurs KM, Lehmkuhl LB, Magnon AL, Weisbrode SE, Atkins CE. Polymerase chain reaction analysis for viruses in paraffin-embedded myocardium from dogs with dilated cardiomyopathy or myocarditis. Am J Vet Res 2001; 62 (1): 130-5.

17. Melcher U, Onodera K, Song Y, Mons B. VirOligo: a database of virus-specific oligonucleotides [database on the Internet]. Dept. of Biochemistry and Molecular Biology: Oklahoma State University (US) c2001 [updated 2001 Jan; cited 2012 Mar 6]. Available from: <http://viroligo.okstate.edu/main.php?vid=BM0941>

18. Merck. El manual Merck de veterinaria. 5ª ed. Barcelona: Océano, 2000: 618-619.

19. Montiel F, Moreno J, Sánchez A, Gutiérrez A, Saldaña A, Ruiz V. Teoría de la reacción en cadena de la polimerasa. Curso Reacción en cadena de la polimerasa PCR y sus aplicaciones multidisciplinarias; 2011 junio 13-24; Cuautitlán (Estado de México) México. UNAM: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, 2011: 1-18.

20. Morgan R, Bright R, Swartout M. Clínica de pequeños animales. 4ª ed. Madrid: Elsevier, 2003: 1093-1094.

21. Navarro C, Celedon M, Pizarro J. Detección de virus herpes canino tipo 1 en Chile. Arch Med Vet 2003; 35 (2): 227-231.

22. Nöthling JO, Hüseyin D, Steckler D, Ackermann M. Seroprevalence of canine herpesvirus in breeding kennels in the Gauteng Province of South Africa. Theriogenology 2008; 69: 276-282.

23. Oliveira EC, Sonne L, Bezerra PS, Teixeira EM, Dezengrini R, Pavarini SP, Flores EF, Driemeier D. Achados clínicos e patológicos em cães infectados naturalmente por herpesvírus canino. Pesq Vet Bras 2009; 29 (8): 637-642.

24. Okuda E, Ishida K, Hashimoto A, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K, Carmichael L. Virus reactivation in bitches with a medical history of herpesvirus infection. Am J Vet Res 1993; 54: 551-554.

25. Parzefall B, Fischer A, Blutke A, Schmahl W, Matiasek K. Naturally-occurring canine herpesvirus-1 infection of the vestibular labyrinth and ganglion of dogs. *The Veterinary Journal* 2011; 189 (1): 100-2.
26. Reubel GH, Pekin J, Webb-Wagg K, Hardy CM. Canine herpesvirus glycoprotein B (gB) gene, complete cds [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c2002 [updated 2003 Apr 15; cited 2012 Mar 6]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF361073.1>
27. Rijsewijk FAM, Luiten EJ, Daus FJ, Van der Heijden RW, Van Oirschot JT. Prevalence of antibodies against canine herpesvirus 1 in dogs in The Netherlands in 1997-1998. *Veterinary Microbiology* 1999; 65: 1-7.
28. Roche Instituto. Glosario de genética: Pseudogen – Pseudogene. (2014). http://www.institutoroche.es/Recursos_glosario_aprender_mas/V200.html
29. Rodes MD. La importancia del herpesvirus en la reproducción. Información técnica. *Eurican Herpes* 205. España. MERIAL. 2003: 1, 24.
30. Roizman B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. The family herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* 1992 ; 123: 425-449.
31. Ronsse V, Verstege J, Onclin K, Farnir F, Poulet H. Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1). *Theriogenology* 2004; 61: 619-636.
32. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: laboratory manual*. 3rd ed. New York: CHSL Press: 2001.

33. Schulze C y Baumgartner W. Nested Polymerase Chain Reaction and In Situ Hybridization for Diagnosis of Canine Herpesvirus Infection in Puppies. *Vet Pathol*; 1998 35: 209.
34. Tanaka T, Nakatani S, Xuan X, Kumura H, Igarashi I, Shimazaki K. Antiviral activity of lactoferrin against canine herpesvirus. *Antiviral Research* 2003; 60: 193-199.
35. VanDevanter DR, Warrenner P, Bennett L, Schultz ER, Coulter S, Garber RL, Rose TM. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J Clin Microbiol* 1996; 34 (7): 1666.
36. Valdivia Lara EG; Solís Sosa J I; Cuenca Verde C; Lara Reyes G.E; Del Río García JC; and Valdivia Anda. 2013, Determination of in vitro Antiviral Effect Against Canine Herpesvirus and its Use in the treatment of skin presentation in Dogs.; 113 th General Meeting, American Society for Microbiology, May 18-21, 2013; Denver Colorado
37. Van Pelt-Verkuil Elizabeth, Van Belkum Alexander, Hays John P. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Netherlands: Springer, 2008: 1-22.
38. Voyles Bruce A. The biology of viruses. 2^a ed. New York: Mc Graw Hill, 2002: 184-186.
39. Yeşilbağ K, Yalçın E, Tuncer P, Yılmaz Z. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in Turkish dog population. *Res Vet Sci* 2012; 92 (1): 36-9.