



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina Veterinaria y
Zootecnia

TESIS □

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA □

LUZ SELENE GONZÁLEZ DELGADO

Aislamiento, identificación molecular y serológica del
Herpesvirus Caprino tipo 1 en un hato ubicado en
Tequisquiapan, Querétaro, México.

ASESORES:

LAURA COBOS MARÍN

IRMA EUGENIA CANDANOSA ARANDA



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.

AGRADECIMIENTOS

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).

Un especial agradecimiento al Dr. Rogelio A. Alonso Morales, a la Bióloga Amanda Gayosso Vázquez y a todos los integrantes del laboratorio de Genética Molecular por poseer el maravilloso don de enseñar, por disfrutar compartir sus conocimientos y formar un grupo de trabajo que se asemeja más a una gran familia. Les agradezco haberme permitido conocerlos no sólo como excelentes profesionistas, si no como las maravillosas personas que son.

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva por estar siempre al pendiente de nosotros, por sus sabios consejos y enseñanzas, por haber creado un ambiente tan familiar entre todos los chicos del laboratorio, por tener el tiempo de escucharme y principalmente por brindarme su afecto, apoyo y consuelo en aquellos momentos que han sido difíciles para mí. Doctora usted siempre tendrá mi más grande admiración y cariño.

A la MVZ. Esp. Liliana M. Valdés Vázquez por ser tan cálida y amable conmigo, siempre con una grata sonrisa y una enorme disponibilidad por ayudarme. Le agradezco enormemente el darme ánimos e impulsarme a continuar. Admiro su bondad, paciencia y ánimo equilibrado, los cuales representan una gran fortaleza, ya que no es fácil saber controlar el carácter, los enojos, las frustraciones o el cansancio para convertirlos en gentileza.

MVZ. Raymundo Iturbe Ramírez el gusto por compartir sus conocimientos siempre apoyándose de metáforas, anécdotas, consejos me permitió entender de una manera más clara todo aquello que deseaba transmitirme sobre la Inmunofluorescencia y la vida. Le agradezco la paciencia y disposición al explicarme todas mis dudas sin importar la hora o lo atareado que se encontrara.

A la MVZ. M en C. Esp. en Microscopía Electrónica Adriana Méndez Bernal por su importante aportación en este proyecto.

DEDICATORIAS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la máxima casa de estudios, a la cual estoy muy orgullosa de pertenecer y donde he crecido personal y profesionalmente.

A la Dra. Laura Cobos Marín, mi asesora, por haberme guiado durante el desarrollo de esta tesis. Gracias por sus valiosos conocimientos, por el trabajo exigido, porque siempre encontré en usted palabras de aliento y confianza para seguir adelante, por ser firme en los momentos que se requería, pero sobre todo porque me demostró en el trayecto de esta tarea que en algunos momentos me resultó tan difícil, que es un gran profesora y más aún un excelente ser humano.

A mi Madre, por ser la amiga y compañera que me ha ayudado a crecer. Porque contigo puedo ser tan auténtica como tu amor. Gracias por estar siempre conmigo en todo momento, por la paciencia que has tenido para enseñarme, por tus cuidados, consejos, cariños, por tu apoyo incondicional, las risas, las bromas, por la complicidad que siempre nos ha caracterizado, gracias mamá por absolutamente todo. Bucay dice que el verdadero amor no es otra cosa que el deseo inevitable de ayudar al otro para que sea quien es, y tu has hecho eso y más por mi. Me gustaría agradecértelo de todo corazón, pero para ti mamá mi corazón no tiene fondo.

A mi Padre, mi Juan Salvador Gaviota, por tu amor paternal, por tu paciencia y tesón, por ser un hombre aferrado a tu convicción, por mantener en alto tus ideales sin perder la calma, siempre tan sereno. Muchas gracias papá por instruirme en la vida y al igual que mi madre enseñarme aquellos valores que tanto los caracterizan: amor, rectitud, compasión, justicia, desinterés, trabajo, verdad y perdón. Eres un gran padre, el mejor de todos y agradezco a Dios de tenerte en mi vida.

A mi Hermana, lo más preciado que mis padres pudieron darme. Nos unen lazos que permanecerán toda la vida, hemos compartido juntas la escuela, los juegos, los amigos, los secretos, hemos vivido todas las cosas buenas y malas. El cariño que nos une no sabe de distancias ni de enojos. Sé que a pesar de ser tan parecidas nuestra personalidad es muy diferente, pero nuestro amor es incondicional. Lo mejor de que seamos hermanas es el sentimiento de amor profundo que nos tenemos, las dos tomaremos nuestro propio camino y tendremos nuestros propios hogares pero siempre cerca una de la otra. Que la vida te colme de bendiciones, te prometo estar a tu lado para compartirlas.

A toda mi familia, mis abuelos, tíos, primos y sobrinos. Pocas personas tienen la fortuna de llevar una relación tan hermosa como nosotros, ustedes son mis consejeros, mis grandes amigos y cómplices. Los mejores momentos de mi vida los he pasado a su lado. Gracias por quererme tanto, por aceptarme, por estar siempre presentes. El contar incondicionalmente con el amor de la familia hace que ésta y todas las etapas de la vida tengas un significado aún más especial.

A Gil, Daphne, Kathia y Coral, y todos aquellos amigos que a pesar de la distancia o el tiempo, siguen estando en mi corazón. A mis amigos de Microbiología, Montse, Pablo, Ninna, Isa, Moni, MariCarmen, Martita, Clau, Pancho, Manu, Migue, Tere, Barushz, Julio y Lázaro, discúlpenme si me falta mencionar al alguien, pero saben que los quiero y le agradezco profundamente sus enseñanzas, su compañía, su amistad, los momentos tan divertidos y frustrantes que hemos compartido, el apoyo mutuo, las horas de trabajo, de café, de ejercicio, de risas, siempre ocuparan un lugar muy especial en mi corazón.

A Enrique Corona Armendáriz, por tu paciencia, consejos, palabras, llamadas, por tu valiosa compañía y tu sincera amistad. Gracias por la ilusión y por la esperanza, por estar en los momentos difíciles y sobretodo porque puedo contar contigo. Te deseo una vida plena, rodeada de salud, felicidad y logros, para ello recuerda esto: "Haz sólo lo que amas y serás feliz. El que hace lo que ama, está benditamente condenado al éxito, que llegará cuando deba llegar. No hagas nada por obligación ni por compromiso, sino por amor. Entonces habrá plenitud, y en esa plenitud todo es posible y sin esfuerzo porque te mueve la fuerza natural de la vida. Dios te puso un ser humano a cargo y eres tú mismo. A ti debes hacerte libre y feliz. Después podrás compartir la vida verdadera con los demás. La felicidad es una adquisición, no es un derecho, sino un deber". F.C.

ABREVIATURAS

CpHV-1: Herpesvirus caprino tipo 1

BoHV-1: Herpesvirus bovino tipo 1

BoHV-5: Herpesvirus bovino tipo 5

CvHV-1: Herpesvirus cérvido tipo 1

CvHV-2: Herpesvirus cérvido tipo 2

RanHV-1: Herpesvirus de alce tipo 1

IBR: Rinotraqueítis Infecciosa Bovina

Vhs: Factor de desconexión del huésped

IHQ: Inmunohistoquímica

CIIN: Cuerpos de Inclusión Intranucleares

ELISA: Ensayo Inmuno Enzimático

EP: Embrión de Pollo

MCA: Membrana Corioalantoidea

MDBK: Madin Darby Bovine Kindey

MEM: Medio Esencial Mínimo

IF: Inmunofluorescencia

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

Mab's: Anticuerpos Monoclonales

REA: Radioinmunoprecipitación

gC: Glicoproteína C

gB: Glicoproteína B

gD Glicoproteína D

gE: Glicoproteína E

gH: Glicoproteína H

gK: Glicoproteína K

gL: Glicoproteína L

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

CONTENIDO

TITULO	I
AGRADECIMIENTOS	II
DEDICATORIAS	III
ABREVIATURAS	V
CONTENIDO	VII
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
EPIZOOTIOLOGÍA	5
CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL	6
PATOGENIA	10
SEMIOLOGÍA	12
LATENCIA Y REACTIVACIÓN	12
DIAGNÓSTICO	14
ANTECEDENTES	16
JUSTIFICACIÓN	17

HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS PARTICULARES	18
MATERIAL Y MÉTODOS	19
I. AISLAMIENTO VIRAL	19
A. EMBRIÓN DE POLLO	20
B. CULTIVO CELULAR	21
II. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	21
III. IDENTIFICACIÓN VIRAL	21
III.I INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA	21
III.II REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	22
III.III CLONACIÓN	24
III.III.I Purificación de Fragmentos de DNA a partir de Gel de Agarosa	24
III.III.II Ligación	25
III.III.III Transformación Bacteriana	26
III.III.IV Minipreparación de DNA del Plásmido	27
III.IV SECUENCIACIÓN	27

RESULTADOS	28
I. AISLAMIENTO VIRAL	28
A. EMBRIÓN DE POLLO	28
B. CULTIVO CELULAR	28
II. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	29
III. IDENTIFICACIÓN VIRAL	29
III.I INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA	29
III.II PCR gC INICIADORES EXTERNOS	30
III.IV SECUENCIACIÓN	30
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	38
FIURAS	39
CUADROS	54
BIBLIOGRAFÍA	58

RESUMEN

GONZÁLEZ DELGADO LUZ SELENE. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y SEROLÓGICA DEL HERPESVIRUS CAPRINO TIPO 1 EN UN HATO UBICADO EN TEQUISQUIAPAN, QUERÉTARO, MÉXICO (BAJO LA DIRECCIÓN DE: DRA. LAURA COBOS MARÍN Y DRA. IRMA EUGENIA CANDANOSA ARANDA)

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 del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ UNAM, se hizo un aislamiento sugerente a CpHV-1.

El objetivo del presente trabajo era realizar la detección molecular y serológica del CpHV-1. La primera por medio de la amplificación de una región correspondiente a la glicoproteína C del CpHV-1, mediante la Reacción en Cadena de la Polimersa (PCR) anidada así como su secuenciación. La segunda mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta, utilizando anticuerpos monoclonales específicos contra el CpHV-1 en el cultivo celular infectado con el virus previamente aislado.

Se detectó una reacción positiva en la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta. Sin embargo, no se logró amplificar la región correspondiente a la gC del CpHV-1, por lo que no se puede concluir que se realizó la identificación del virus en México.

INTRODUCCIÓN

El Herpesvirus Caprino Tipo 1 (CpHV-1) pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *α-herpesvirinae* género *Varicellovirus*. Este virus posee un ADN lineal de doble cadena, con una cápside icosaédrica de 100 a 110 nm de diámetro^{1, 2, 3, 4}. Se estima que el tamaño del genoma del CpHV-1 es de 137 kpb⁵.

El CpHV-1 infecta células epiteliales *in vivo* e *in vitro*, tiene un ciclo de infección corto y citolítico, es un virus neurotrópico pues establece una infección latente en el ganglio sacro, el cual pertenece a los ganglios paravertebrales del sistema nervioso simpático.⁶

La arquitectura del virión es probablemente el rasgo más característico de este conjunto de virus para considerarlo como miembro de la familia *Herpesviridae*. Un virión de herpesvirus presenta cuatro estructuras morfológicas bien diferenciadas⁷ (ver figura 1).

El centro o core compuesto por una molécula de ADN^{8, 9, 10} protegido por una cápside icosaédrica conformada por 150 hexámeros y 12 pentámeros, la cual a su vez es rodeada por una capa formada por más de 15 proteínas denominadas tegumento. 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^{7,10}. El rango en el diámetro del virión es de 120 a 300 nm¹⁰. La síntesis de ADN viral y el ensamblaje de la cápside ocurren en el núcleo celular.^{7,8,10} (ver figura 3).

Actualmente se conoce la secuencia genómica completa de 32 especies de herpesvirus^{8,11}. El análisis comparativo del genoma de las diferentes especies refleja que todos los

herpesvirus conservan un grupo de 25-40 genes comunes^{8,11}. Éstos se denominan genes “core” y codifican para proteínas de regulación génica, enzimas de metabolismo de nucleótidos, componentes del complejo de replicación del ADN, proteínas de maduración del virión, proteínas de la cápside y algunas proteínas del tegumento y de la envoltura. Los genes “core” se agrupan en 7 bloques de genes conservados (bloque I al VII), y mantienen un orden y una orientación transcripcional dentro de cada bloque. Por otro lado, estos bloques presentan un orden y una orientación diferente en cada una de las subfamilias que componen los *Herpesviridae*.^{8,11}

Como se describió anteriormente, la envoltura de un virión de herpesvirus es una bicapa lipídica en la que se hallan integradas distintas proteínas, en su mayoría glicoproteínas de origen vírico¹². Estas proteínas son las más estudiadas de los herpesvirus y 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.¹³

Las glicoproteínas de la envoltura de los herpesvirus están codificadas por genes y entre ellos se pueden distinguir algunos genes “esenciales” y otros “no esenciales”. 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 o en la señalización de la ruta celular de transmisión de la infección. Las

glicoproteínas no esenciales son el mejor ejemplo de cuan impreciso es calificar como no esencial un conjunto de genes y de proteínas a partir de un estudio de cultivo *in vitro* en el que las células utilizadas no son representativas de aquellas que el herpesvirus infecta *in vivo*.^{7,8}

El primer aislamiento viral se llevó a cabo en 1970 en California¹⁴, a partir de la replicación del virus en tejidos de cabritos recién nacidos que habían desarrollado una enteritis severa. Unos años más tarde el CpHV-1 fue aislado en Nueva Zelanda y Australia en cabras con vulvovaginitis severa¹⁵. El virus también fue identificado a partir de lesiones prepuciales en Noruega y ha sido detectado en Grecia, y aislado de cabras con infección latente en Italia y España en el año 2004.¹⁶

Los herpesvirus han co-evolucionado con sus hospederos durante millones de años. En consecuencia, diferentes hospederos pueden haber sido infectados por distintos herpesvirus genéticamente relacionados. Se ha demostrado que un grupo de alphaherpesvirus de rumiantes está estrechamente relacionado: 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).¹⁰ Análisis filogenéticos de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la glicoproteína B (gB) y la glicoproteína D (gD) revelan que el CpHV-1 es el más distante entre estos alphaherpesvirus de rumiantes (ver figura 2).^{17,18}

Con base en la secuencia completa de la gB, la más conservada entre los herpesvirus¹⁹, el porcentaje de identidad en la secuencia de nucleótidos entre el CpHV-1 con respecto al

BoHV-1 es del 78.5%.¹⁷ En la gD la homología entre estos dos virus es del 68.8%²⁰ y finalmente en la glicoproteína C (gC) es del 55.6%²¹(Figura 2).

EPIZOOTIOLOGÍA

Esta enfermedad afecta a cabras de diferentes edades y puede ser responsable de grandes pérdidas económicas en la producción animal, principalmente por la presencia de abortos, muerte neonatal y el reemplazo de animales adultos. El CpHV-1 tiene una distribución mundial mayor al 50%, con una elevada seroprevalencia.²² que se presenta principalmente en la cuenca mediterránea y ha aumentado en los últimos años.^{23, 24}

En un estudio realizado en 759 cabras de distintos lugares de Grecia, fueron identificados anticuerpos neutralizantes en 52.6% de los animales.²⁵ Los anticuerpos maternos disminuían a la edad de 4 meses, creándose nuevos a los 7-8 meses. Las observaciones realizadas en dos rebaños caprinos intensivos mostraron que el virus no se propagaba durante el período de apareamiento y lactancia. Los títulos de anticuerpos neutralizantes aumentaban o se presentaban nuevas infecciones en los animales después del verano, durante la época de partos.²⁵ En México no se han realizado pruebas serológicas en busca de anticuerpos para esta enfermedad.

En España en el año 2006 se llevó a cabo una encuesta seroepidemiológica para determinar la presencia de la Herpesvirosis Caprina. El análisis de 381 sueros de cabras distribuidas en varias explotaciones de Andalucía demostró que el CpHV1 se encontraba presente con una prevalencia del 21.3%.²⁶ Además se realizó un ensayo de reactivación en dos cabras Murciano-Granadina seropositivas, ambas tenían 3 años respectivamente y fueron tratadas

con 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 de la cepa suiza de referencia^{9,26}. En el año de 2008, la infección por CpHV-1 fue identificada en Francia.²⁴

El incremento en la prevalencia clínica o en la seroconversión puede ocurrir después del inicio de la temporada de cría, sugiriendo una transmisión venérea a partir de una nueva infección o del recrudecimiento de una infección latente secundaria asociada al estrés producido por el estro o la temporada de parto.^{1, 9, 15}

CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL

El CpHV-1 entra a las células por fusión de su envoltura con la membrana plasmática celular, siendo un proceso independiente de pH y dependiente de la unión de glicoproteínas virales presentes en la envoltura del virus con los receptores en la membrana celular.²⁷ 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.^{28,29}

Aunque la totalidad de las moléculas involucradas en la entrada del virus a la célula no están completamente definidas, está claramente establecido que éste se une a las moléculas de heparán sulfato (HS) presentes en la membrana celular,²⁹ a través de las glicoproteínas virales gB y gC.³⁰ Luego de esta unión inicial, las gB y gD se unen con alta afinidad a sus receptores en la membrana celular.³¹

Como se explicará más adelante la gC juega un papel primordial en la identificación y diferenciación del CpHV-1 con respecto al resto de los α -Herpesvirus. 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 proteoglicanos para promover la interacción de otra glicoproteína, la gD, con un receptor secundario.^{32,12} 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/L.¹²

La gC es no es esencial para la replicación de los herpesvirus *in vitro*.^{30,31} Sin embargo, la gC participa en la estrategia de evasión del sistema inmunológico del organismo hospedador.^{33,34} La gC del Herpesvirus simplex (HSV) es una de las moléculas de evasión del sistema de complemento mejor caracterizadas, ésta se une al factor C3 y a sus productos de activación C3b, iC3b y C3c, acelera la regulación de la vía alterna del complemento (C3 convertasa) que da lugar a estos productos, e inhibe la unión de C3b a los factores del complemento: properdina y C5.^{35,36} Con esto la gC protege al virus del ataque del complemento *in vivo*, tanto en estado libre al inhibir su activación, como al impedir la lisis de las células infectadas mediada por complemento.^{35,36,37,38}

Después de la entrada a las células del hospedero, la nucleocápside del CpHV-1 es liberada en el citoplasma donde es transportada a través de microtúbulos hasta el núcleo. Ciertas proteínas del tegumento, como VP16 comienzan de la transcripción del genoma viral en el núcleo de la célula, mientras que otros factores tales como el "factor de desconexión del huesped", (Vhs) por sus siglas en inglés, actúan en el citoplasma.³⁹

La nucleocápside viral se ancla al poro nuclear liberando su ADN viral dentro del núcleo donde es circularizado. Dependiendo del momento en que los genes virales son expresados

durante la replicación son clasificados en tres clases: inmediatos tempranos, tempranos y tardíos.^{11, 39}

La proteína VP16, activador transcripcional del virión, interactúa con los componentes de transcripción del hospedero para estimular la transcripción de los genes inmediatos tempranos mediante la RNA polimerasa II celular, los RNA mensajeros inmediatos tempranos (RNAm) son ensamblados y transportados hacia el citoplasma donde son traducidos en proteínas inmediatas tempranas (α proteínas), nuevamente son llevadas hacia el núcleo donde activan la transcripción de los genes tempranos además de continuar regulando la transcripción de los genes inmediatos tempranos.³⁹ Los transcritos de los genes tempranos son transportados hacia el citoplasma donde son traducidos en proteínas tempranas (β proteínas) en donde su función principal es la replicación del ADN y la producción de sustratos para la síntesis del mismo. Algunas β proteínas son transportadas al citoplasma y otras permanecen en el núcleo.³⁹ En esta síntesis de ADN viral se producen moléculas largas concatémicas, es decir, replicaciones en círculo formando copias del genoma vírico completo unidas una a continuación de la otra y separadas por sitios o secuencias "cos" (una secuencia especial de nucleótidos a la que se unen ciertas proteínas y que aparecen entre cada copia del genoma). Estas moléculas a su vez representan los templates para la expresión de los genes tardíos.³⁹ Los RNAm tardíos son transportados hacia el citoplasma para su traducción en proteínas tardías (γ proteínas). Las proteínas tardías son principalmente proteínas estructurales del virión, así como proteínas necesarias para el ensamblaje y salida del mismo.³⁹

Algunas γ proteínas requeridas para la formación de la envoltura viral son elaboradas en las membranas del retículo endoplásmico rugoso donde son modificadas por glicosilación. Estos precursores son transportados al aparato de Golgi para su procesamiento final en glicoproteínas maduras las cuales son llevadas hacia la membrana citoplasmática de la célula infectada. Otra parte de las γ proteínas son acarreadas al núcleo celular para el ensamblaje del ADN y la nucleocápside, mientras que el resto permanece en el citoplasma.³⁹

El nuevo ADN viral replicado se mantiene dentro de cápsides preformadas junto con algunas proteínas del tegumento, mediante procesos de gemación en la membrana nuclear interna se dirige al lumen del retículo endoplásmico rugoso adquiriendo una envoltura, que se piensa, contiene precursores de proteínas de membrana viral.³⁹

El paso del virus envuelto desde el lumen del retículo endoplásmico rugoso hacia la salida del virus no está completamente definido. Existen dos mecanismos posibles: En el primero el virus envuelto se fusiona con la membrana del retículo endoplásmico rugoso liberando la cápside en compartimentos del aparato de Golgi que contienen proteínas de membrana viral madura. Las proteínas de tegumento adheridas al núcleo permanecen junto con la cápside mientras que el resto se van añadiendo del citoplasma durante este paso. El virus envuelto es transportado a la membrana citoplásmica para su liberación por exocitosis.^{39,40}

En el segundo modelo el virus dentro del lumen del retículo endoplásmico rugoso es envuelto en vesículas para ser transportado y llevado al aparato de Golgi para que las

proteínas precursoras de la envoltura viral sean modificadas y procesadas por enzimas dentro de sus compartimentos. Finalmente el virus envuelto es transportado a la membrana citoplásmica para su salida por exocitosis.³⁹

En ambos modelos las vesículas de transporte se fusionan con la membrana citoplásmica para liberar al virión completamente maduro al espacio extracelular. (ver figura 3)^{39,40}

La replicación del genoma comienza dentro de las dos horas siguientes a la infección inicial del animal,⁴¹ 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.⁴²

El CpHV1 está estrechamente relacionado con el BoHV-1, este último se ha considerado como virus de referencia para el estudio del CpHV-1 debido a 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.^{2,9,12,17,18,21}

PATOGENIA

Las partículas víricas de los herpesvirus son lábiles y no tienen una buena permanencia fuera del organismo infectado. La vía de entrada del CpHV-1 puede ser nasal y genital.^{2,4} En general, su transmisión requiere un contacto directo, principalmente uno físico que conlleve la aposición de epitelios húmedos.⁴³

La infección inicial del CpHV-1 en líneas celulares permisivas, células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK), conduce primordialmente a una rápida muerte celular ocasionada por un estado apoptótico dado por la activación de diferentes caspasas celulares (principalmente caspasa 3) y de la proteína P53.^{44,45} Resultados similares han sido reportados ante la

infección *in vivo* de terneros con la cepa Cooper de BoHV-1, llevando a un aumento de los niveles de apoptosis en linfocitos T CD4+ infectados.⁴⁶ Durante la expresión génica en la infección primaria, los genes son transcritos en una cascada coordinada, regulada y secuencial, la cual es común a todos los miembros de esta familia viral.⁷

Después de una infección intranasal, se presenta una replicación local produciendo una lesión epitelial en la cavidad nasal, seguida por una viremia asociada a células mononucleares, que puede llevar a una infección sistémica y abortos. El virus finalmente alcanza el tracto genital, con la aparición de las lesiones características: vulvovaginitis ulcerativa en hembras y balanopostitis ulcerativa en machos, ambas con altos títulos virales.⁴⁷ En los animales infectados la enfermedad tiene una presentación aguda y latente.

Durante la presentación aguda, el virus es excretado vía ocular, nasal y genital.^{14,47}

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,¹⁴ los informes tanto de infección natural como experimental, indican que el aborto y los neonatos muertos causados por el CpHV-1 son resultado de la viremia.^{14,47} Se sugiere que el virus permanece latente en la placenta, y cuando pasa al feto, produce lesiones necróticas diseminadas, ya que los fetos abortados y neonatos muertos demuestran la presencia del CpHV-1 o el ADN viral en hígado, epidermis, riñones, pulmones, cerebro y glándulas adrenales.^{14,47,48}

En el caso de los neonatos la enfermedad sistémica está caracterizada por una elevada morbilidad y mortalidad provocada por una enteritis necrótica.⁴⁹

Por el contrario, después de una infección genital hay una replicación viral masiva, restringida a la mucosa genital, con aparición de eritema, edema, vesículas y úlceras de distribución multifocal.⁴⁷

Cuando las cabras son inoculadas intravaginalmente de manera experimental, la presencia de la infección se manifiesta con lesiones genitales, y el virus se puede aislar 5 a 7 días pos infección a partir de hisopos vaginales y no de hisopos oculares, nasales o rectales; sugiriendo que la infección genital puede establecerse sin causar viremia.⁵⁰

SEMIOLOGÍA

La manifestación de signos y lesiones a causa de una infección por el CpHV-1 dependerá en gran medida del estado inmunológico y nutricional del animal. 2^{51,52,53} Durante una infección sistémica se pueden presentar abortos⁹, muerte embrionaria y/o muerte neonatal,^{2,15,51,53} además se asocia con enfermedad respiratoria, pérdida de peso y disminución de la producción láctea.^{2^{15,51,53}} En neonatos se manifiesta con enteritis, diarrea y enfermedad sistémica. 1^{47,54}

Durante una infección local se origina una vulvovaginitis 1'2 y balanopostitis pustular infecciosa de moderada a grave. En las hembras, los signos clínicos de vulvovaginitis se presentan dentro de los primeros 11 días después de la introducción de los sementales.1

LATENCIA Y REACTIVACIÓN

El CpHV-1, al igual que la gran mayoría de miembros de la subfamilia Alphaherpesvirinae, establece latencia durante toda la vida del hospedero en neuronas ganglionares del sistema nervioso periférico.⁵⁵

Luego de la replicación inicial en el epitelio mucoso, la nucleocápside del virus es direccionada por transporte axonal retrógrado 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. Tiempo después, durante eventos de estrés, inmunosupresión o uso prolongado de corticoides, el virus puede reactivarse, produciendo partículas virales que migran en forma centrifuga usando el transporte axonal anterógrado de la misma neurona por la cual ascendieron, alcanzando el sitio inicial de replicación, para poder así dispersarse a otros animales susceptibles.^{56,55}

Los pasos del ciclo de latencia y reactivación han sido operacionalmente divididos en tres: establecimiento, mantenimiento y reactivación.⁵⁶

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; luego la expresión de genes virales es suspendida o disminuida drásticamente, y en lugar de los 80 genes virales que se expresan durante la infección lítica, en la fase latente sólo se da la expresión de dos transcritos virales: un transcrito relacionado con latencia (RL) y el ORF E, que son abundantemente expresados en los ganglios neuronales durante la latencia.⁵⁶(ver figura 4)⁵⁵

El mantenimiento de la latencia es un paso que puede durar toda la vida del hospedero; técnicamente, se define como 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 (genes de ciclo lítico).⁵⁶

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico del CpHV-1 se realiza a partir de tres pruebas, dos de ellas son serológicas: el Inmuno Ensayo Enzimático (ELISA) y la seroneutralización (SN) y una prueba es molecular: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).^{21,24,}

*ELISA. Cabe señalar que no se cuenta con pruebas comerciales para el diagnóstico de CpHV-1 y debido a que existe una reacción cruzada con el BoHV-1, para el diagnóstico serológico se han utilizado pruebas comerciales de ELISA para Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) como: SERELISATM IBR/IPV gB Ab Mono Blocking, Synbiotics Europe, Lyon, France) y gE (Herdchek Anti-IBR gE, Idexx, Germany), ambas pruebas son ELISAS competitivas.^{26,47}

*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 o 75 UFP de la cepa Iowa de BoHV-1^{57,58,}

*PCR Y PCR EN TIEMPO REAL. Esta prueba se realiza 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).^{14,16,21,51}

Al existir una relación genética y antigénica entre estos 5 *alphaherpesvirus* de rumiantes (BoHV-1, BoHV-5, CvHV-1, CvHV-2, y CpHV-1) en Julio de 2003 en el Laboratorio de Virología e Inmunología del Departamento de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Bélgica se diseñó una nueva estrategia diagnóstica a través de anticuerpos monoclonales murinos (Mabs) por sus siglas en inglés, con el propósito de montar una prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IF) que permitiera discernir entre ellos sin ambigüedad.⁵⁹ Los Mabs fueron seleccionados por su especificidad viral mediante pruebas de ELISA así como por ensayos de IF en donde se infectaban de manera individual células MDBK con los distintos virus.⁵⁹

La cepa de referencia de CpHV-1 utilizada fue la E/CH (cepa Suiza). Cada anticuerpo monoclonal detectó específicamente una sola especie viral.⁵⁹

Finalmente, se buscó determinar si los Mabs seleccionados sólo eran específicos para la cepas utilizadas en las infecciones de los ratones, por lo que también fueron probados en células infectadas con otras cepas reportadas del CpHV-1 y del BoHV-1. Estas fueron: para CpHV-1 Mck/US (cepa Estadounidense), Ba-1 (cepa Italiana), SP1 y SP2 (cepas Españolas).⁵⁹ Los resultados demostraron que la especificidad de los Mabs fue similar a la mostrada con la cepa de referencia E/CH.⁵⁹

Por medio de Radioinmunoprecipitación (RIPA) se reveló que los Mabs utilizados se dirigían contra la gC.⁵⁹ Como ya se mencionó, esta glicoproteína es genética y antigénicamente menos conservada que las glicoproteínas B y D^{17,18,20} por lo que no resulta sorprendente que la mayoría de los Mabs que permitían discriminar entre estos virus se dirigían directamente a dicha glicoproteína.⁵⁹

Al existir una región N-terminal altamente variable en la gC de estos virus, se cree que los anticuerpos específicos utilizados en este estudio van directamente en contra de este epítotope, mientras que los anticuerpos que presentaron una reacción cruzada, y por tanto no fueron seleccionados, se dirigían a la región central de la gC, la cual es conservada entre estos alphaherpesvirus.^{17,18} (ver figura 5).⁵⁹

ANTECEDENTES

En México, el único informe que se tiene sobre la posible presencia de esta enfermedad es un brote sospechoso a CpHV-1 ubicado en el municipio de Tequisquiapan, Querétaro, en un rebaño de 244 cabras, en noviembre del 2008. Hasta el momento se desconoce cómo se introdujo la enfermedad en el rebaño, ya que antes del brote se ingresaron varios animales de otros rebaños.²² 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 grave, y balanopostitis pustular y ulcerativa grave multifocal coalescente. Microscópicamente, además de las lesiones inflamatorias se observó presencia de cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos.²²

Las muestras de prepucio para microscopía 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.²²

Fueron realizadas 4 necropsias, 2 hembras adultas y un macho adulto en el mes de enero de 2009 y un neonato nacido muerto en el mes de junio del mismo año. Los animales adultos fueron eliminados del rebaño por bajo rendimiento productivo y sacrificados en la sala de necropsias. En los cortes histológicos de pene y vulva de las 3 necropsias realizadas se llevó a cabo una inmunohistoquímica (IHQ) con anticuerpos BoHV1, los resultados obtenidos mostraron una ligera positividad en las células epiteliales.²²

En el laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM se hizo el aislamiento viral a partir de una biopsia de prepucio que se conservó en congelación hasta su procesamiento.

En este aislamiento se observó el efecto citopático sugerente a CpHV-1, pero no se realizó su tipificación.²²

JUSTIFICACIÓN

Dado que se desconoce la epizootiología de la enfermedad originada por el CpHV-1 en nuestro país y debido a que existen informes de otros rebaños en la zona de Tequisquiapan, en los que se ha presentado la signología clínica sugerente a CpHV-1, es importante confirmar la presencia del virus en México, mediante su aislamiento e identificación molecular y serológica.

HIPÓTESIS

La vulvovaginitis y balanopostitis presentes en el rebaño caprino del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en el Altiplano son producidas por Herpesvirus Caprino tipo 1, por lo que se podrá aislar e identificar el virus tanto por técnicas moleculares como serológicas.

OBJETIVO GENERAL

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 y serológica de un aislamiento viral obtenido en el año 2011.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar el aislamiento del CpHV-1 a partir de muestras de animales con lesiones sugerentes a la infección, mediante su inoculación en embrión de pollo y cultivo celular, para su posterior identificación molecular y serológica.
- Identificar en los cultivos celulares previamente infectados la presencia de partículas virales sugerentes a herpesvirus, mediante microscopía electrónica.
- Identificar al CpHV-1 previamente aislado en cultivo celular, mediante la técnica de Inmunofluorescencia, para demostrar la presencia del CpHV-1 en los aislados obtenidos.
- Amplificar la región de la glicoproteína C, empleando una PCR anidada, para distinguir entre el herpes virus bovino (BoHV-1) y el CpHV-1.

- Clonar y secuenciar la región de la glicoproteína C, para comparar el aislamiento mexicano con otros reportados en la literatura.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología; en el laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y Bioestadística y en la Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación (USEDICO) del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA), todos ellos pertenecientes a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM).

VIRUS. Se utilizó un aislamiento obtenido a partir de una biopsia de prepucio de un caprino Alpino Francés del hato donde ocurrió el brote sospechoso a Herpesvirus Caprino tipo 1 proveniente de Tequisquiapan Querétaro, en el año 2011.

I. AISLAMIENTO VIRAL :

- Obtención de la muestra

El aislamiento viral se obtuvo a partir de una muestra de prepucio de un macho con número de identificación R125, raza Alpina Francesa de 80.3 meses de edad el cual presentaba lesiones sugerentes al CpHV-1. La muestra fue tomada el 20 de Junio de 2011 y fue enviada al laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ para su aislamiento.

La muestra de prepucio se maceró y se preparó a una concentración al 10% con PBS estéril, posteriormente se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min. El sobrenadante obtenido se filtró en una membrana estéril de 0.45 μm . La ausencia de contaminación bacteriana en la suspensión viral se verificó mediante la siembra en medios bacteriológicos (agar triptosa y caldo tioglicolato 0.1ml) los cuales se incuban a 37°C por 48 h.

A. EMBRIÓN DE POLLO

Se utilizaron embriones de pollo (EP) de 9 a 11 días para la inoculación del CpHV-1 por la vía de membrana corioalantoidea. Éstos se examinaron con el ovoscopio para verificar su viabilidad, se delimitaron los sitios de inoculación mediante 3 marcas: una en el polo superior del EP sobre la cámara de aire, la segunda en la posición del embrión con una "X" y la tercera se realizó en un punto del lado contrario al embrión en una zona equidistante de ambos polos y libre de grandes vasos sanguíneos. Las zonas señaladas se desinfectaron con yodo, se perforó el cascarón y la fáfara en el punto señalado sobre la cámara de aire, posteriormente se perforó el cascarón sin lesionar la membrana corioalantoidea (MCA) en la marca lateral del EP. Una vez hecho esto, se colocó el embrión en posición horizontal frente al ovoscopio y se hizo un ligero vacío con una perita de goma aplicada al polo superior del EP, para formar una nueva cámara de aire dispuesta en uno de los lados.

Los embriones se inocularon con 0.2 ml insertando la jeringa en un ángulo de 45° a través del orificio lateral del cascarón con el bisel de la aguja hacia abajo hasta una profundidad de 6 mm, una vez finalizado el procedimiento el orificio de inoculación se sellaron con pegamento líquido. Posteriormente los EP se incubaron a 37°C, y se revisaron diariamente en busca de mortalidad. Cinco días después se sacrificaron mediante refrigeración por 8

horas. Las membranas se cosecharon en busca de lesiones características (pústulas blanquecinas, edema o hemorragias). En caso de no observar lesión, se hizo un pase ciego en busca de ésta. (ver figura 6).

B. CULTIVO CELULAR

Se utilizó la línea celular MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) cultivada con Medio Esencial Mínimo (MEM) suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibiótico (penicilina y estreptomycin). Para la infección se eliminó el sobrenadante, se procedió a agregar el inóculo y se mantuvo en agitación durante 1 hora. Pasado este tiempo se agregó MEM sin suero fetal bovino y se incubó hasta observar el efecto citopático, que se manifestó por la presencia de lisis celular a las 72 horas pos infección (PI). Como testigo negativo se mantuvo un cultivo sin infectar incubado bajo las mismas condiciones que el anterior.

II. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Se emplearon células MDBK infectadas con el virus sugerente a CpHV-1 durante 72 horas. Éstas fueron fijadas con glutaraldehído al 5% y se enviaron al departamento de Patología de la FMVZ, UNAM.

III. IDENTIFICACIÓN VIRAL

III.I INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA

Para llevar a cabo el ensayo de inmunofluorescencia indirecta se realizó la infección de un cultivo celular de la línea MDBK con el virus sospechoso a CpHV-1, las células se

incubaron en cámaras de cultivo celular sobre laminillas (Lab-Tek™ Chamber Slide™ System) por 72 y 100 horas en busca del efecto citopático: muerte celular. (ver figura 7)

Posteriormente se decantó el medio de cultivo de las células, se realizó un lavado con PBS y se fijaron con una solución compuesta por 90% de etanol puro, 5% de ácido acético glacial y 5% de agua destilada durante 30 min a temperatura ambiente.

Se retiró el fijador y se agregó el anticuerpo monoclonal anti C_pHV-1 de origen murino sin diluir (donado por el Dr. Etienne Thiry, con autorización de SAGARPA, No. de Requisición IDOD11AD0339). La muestra se incubó durante 30 min a 37°C en cámara húmeda, realizándose dos lavados con PBS.

El anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Santacruz Biotechnology Inc.) se utilizó en una dilución 1:25, incubándose nuevamente durante 30 min a 37 °C en cámara húmeda.

Finalmente se realizaron dos lavados, el primero con PBS y el segundo con agua destilada. Se decantó el agua destilada y se dejó secar durante 10 min. Una vez que el cultivo estuvo listo se observó en un microscopio para Inmunofluorescencia marca Leica modelo DM1000 con lámpara de mercurio HB050, compuesto por los objetivos 20X/0.40 plan α / 0.17 y 40X/0.65 plan α /0.17, oculares 10X/22 plan, filtros de 450-490, FT510, LP520 y cámara pixera penguin 600 CL.

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

- Extracción del ADN. Se hizo a partir de un cultivo celular de línea MDBK previamente infectado con el virus sospechoso a CpHV-1, mediante el siguiente procedimiento:
 - Agregar 0.75-1.0 ml de DNAzol® Reagent de invitrogen a 10 cm² de monocapa celular. Transferir a un micro-tubo de 1.5ml
 - Centrifugar a 10,000 g a 4°C por 10 min
 - Transferir el sobrenadante a otro tubo
 - Precipitar el ADN añadiendo 500 µl de etanol al 100%
 - Mezclar por inversión 3-6 veces
 - Incubar mínimo 1 h a -20°C
 - Centrifugar a 12 000 g, 4°C, 10 min.
 - Decantar el sobrenadante.
 - Lavar el ADN con 1 ml de etanol al 75% centrifugar 10,000 g a 4 °C por 5 min.
 - Retirar el sobrenadante (el lavado se realiza dos veces).
 - Dejar secar 30 seg en la campana de flujo laminar o gabinete de seguridad biológica.
 - Disolver la pastilla en 100 µL de agua inyectable
 - Incubar por 10 min a 60°C
- AMPLIFICACIÓN:

Para la identificación molecular de este virus se diseñó una PCR anidada, mediante programas de computo especializados (Vector NTI®software). Para ello se alinearon las secuencias del gen de la gC tanto del virus bovino (BoHV-1) como del CpHV-1 y se diseñó

un primer juego de iniciadores (iniciadores externos) el cual amplifica una región de 480 pb en ambos virus (ver cuadro 1 y 2) (ver figura 8) y una segunda reacción de PCR (iniciadores anidados o internos) con un juego específico para CpHV-1 (ver cuadro 3 y 4) (ver figura 9) y otro para BoHV-1, para diferenciar entre estos virus (ver cuadro 5 y 6) (ver figura 10).

Con la finalidad de manejar un testigo positivo para esta prueba, se utilizó ADN de un aislamiento de BoHV-1. Este ADN de BoHV-1, fue previamente identificado mediante una PCR que amplifica la región de la glicoproteína E de BoHV-1.

III.III CLONACIÓN

Debido a que se obtuvo una única banda de peso molecular de 600 pb en la PCR externa tanto en el virus sospechoso a CpHV-1 como en el testigo positivo de BoHV-1 y a que la PCR anidada generaba un bandeo inespecífico, se tomó la decisión clonar y secuenciar esta banda, aún cuando presentaba un peso molecular mayor al esperado. Cabe señalar que al no tener un virus de referencia y al encontrar en ambos aislamientos (bovino y caprino) esta banda, era importante determinar si correspondía a la glicoproteína.

III.III.I) Purificación de Fragmentos de ADN a partir de Gel de Agarosa

Se realizó la electroforesis del producto a purificar en agarosa-TAE, en la cual se cargó el volumen total que se amplificó, en este caso 40 μ L de producto de PCR. Se recortó la banda con ayuda de un transiluminador.

Se pesó el fragmento y se adicionaron 3 volúmenes de yoduro de sodio 6 M. Se incubó por 10 min a 55°C hasta que la agarosa se disolviera. Se adicionaron 15 µL de perlas de sílica* y se incubaron por 60 min a 4°C. Posteriormente se centrifugó por 4 min/12 000 rpm/ 4°C y se decantó y resuspendió la pastilla con 500 µL de solución de lavado*, nuevamente se centrifugó a 12 000 rpm/4 min/4°C y se repitió una vez más este paso.

Se decantó el tubo y se secó la pastilla por calor. Se resuspendió en 30µL de agua estéril, se incubó a 55°C por 5 min y se centrifugó a 12,000 rpm/4 min/Temperatura ambiente (TA). Finalmente se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio y se visualizaron 5 µL de la purificación en un gel de agarosa al 3%.⁶⁰

*Solución de lavado: NaCl 50 mM, Tris HCl pH 7.5 10 mM, EDTA 2.5 mM, etanol 50% v/v. ⁶⁰

*Perlas de sílica: Suspensión de sílica a 100 mg/ml en PBS, centrifugar 2 min/ 2 000 g, resuspender la pastilla a una concentración final de 100 mg/ml en NaI 3M. Alicuotar en volúmenes de 500 µL y cubrir de luz con papel aluminio. Refrigerar.⁶⁰

III.III.II) Ligación

Se clonaron los fragmentos en el kit pGEM-T de Promega (ver figura 11). En el cuadro 7 se muestra la reacción de ligación.

Fórmula para calcular la cantidad de ADN de inserto requerido a una relación 1:1 con el vector:

$$\text{Longitud del inserto (Kb) ng vector} = \frac{\text{Longitud del vector (Kb)}}{\text{Longitud del inserto (Kb)}}$$



$$\text{Vector: } \frac{0.600 (50 \text{ ng})}{3.000} = 10 \text{ ng}$$

III.III.III) Transformación Bacteriana

Se mezclaron 100 μL de células competentes DH5 α con 30-50 ng de ADN (vector). Se incubaron 30 min a 4°C e inmediatamente se incubaron a 42°C por 1 minuto, nuevamente se incubaron a 4°C por 2 min (ver figura 12). Se adicionó medio LB (cbp) 1 ml (cuadro 8). Se incubó a 37°C/ 1 h y se mantuvieron en agitación (100-120 rpm 5 min). Se sembraron 100 μL en placas con LB, ampicilina, Xgal, IPTG y se almacenaron a 37°C toda la noche (ver figura 13).

Se seleccionaron 16 colonias blancas, cada mitad de la colonia se sembró en medio LB-ampicilina (ver figura 14), la otra parte se resuspendió en 60 μL de agua estéril (ver figura 15), se realizó una PCR utilizando los iniciadores de M13 (diseñados para la amplificación de insertos clonados con el vector pGEM) con el objetivo de identificar a las bacterias recombinantes (ver cuadro 9 y 10).

El peso esperado era de 838 pb, ya que el peso del polilinker (sitio múltiple de clonación) es de 238 pb, por lo tanto: Bacterias Recombinantes (600 pb del inserto) + 238 pb polilinker= 838 pb esperadas. Se corrió una electroforesis en un gel de agarosa al 3%, utilizando el marcador de peso Lambda λ (ver figura 16).

Las colonias recombinantes estaba en la colonia: 3, 5, 8, 12, 13 y 15. Se seleccionaron las colonias 5, 8 y 12. Se crecieron en caldo LB-ampicilina toda la noche en agitación.

III.III.IV) Minipreparación de ADN del Plásmido

Se centrifugó a 3 500 rpm/6 min el crecimiento bacteriano a purificar (3 ml). Se decantó y se adicionó a la pastilla 200 μ L de *solución de lisis, se resuspendió con micropipeta. Se incubó 10 min/ TA. Se hirvió en baño de agua por 1 minuto (haciendo previamente un orificio en el tapón del tubo con ayuda de una aguja). Se centrifugó 10 min /12 000 rpm. Se recuperó el sobrenadante (el ADN requerido para la secuenciación se trata con RNAsa (15 μ g/ml final), se incubó 30 min a 37°C. Posteriormente se agregó Proteinasa K (50 μ g/ml final), se incubó a 50°C/ 1h. Se hirvió por 2 min y se adicionó NaCl 2M final, se centrifugó a 14000 rpm/ 10 min

⁶¹. Se continuó con la precipitación y se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se incubaron por 30 min a -20°C. Se centrifugó a 14 000rpm/10 min (decantar). Se lavó la pastilla adicionando 300 μ L de etanol al 70%, se centrifugó 5 min/10 000 rpm y se decantó. Se repitió una vez más este paso. Se decantó y secó la pastilla por calor y se resuspendió en 100 μ L de agua estéril. Finalmente se corren de 3-5 μ L en un gel de agar al 1%. Se almacena a -20°C (ver figura 17).

*Solución de Lisis: 8% Sacarosa, 5% Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8.

III.IV) SECUENCIACIÓN

Se realizó una variante de la PCR llamada "PCR de secuencia". En ella sólo se añade un iniciador en lugar de dos, quedando uno de los extremos de la hebra libre. En este caso se añadieron dNTP's diferentes, son una mezcla de dNTP's normales y dNTP's marcados con fluorocromos. Así, la Taq ADNpolimerasa fue incorporando estos dNTP's a las cadenas

amplificadas hasta que se añadió un dNTP que, como no dispone de un extremo OH 3', impidió que la Taq ADN polimerasa continuara añadiendo más nucleótidos. De esta forma, se obtuvo un conjunto de cadenas que terminaron en un dNTP marcado con una molécula fluorescente, el cual fue leído por el secuenciador para indicar a éste de que base se detectó. Al terminar la PCR de secuencia fue necesario eliminar los restos de reactivos para que no interfieran en la posterior lectura. Para ello las muestras se pasaron por columnas con sephadex G50 previamente equilibradas, se centrifugaron durante 4 min a 2700 rpm y, a continuación, fueron secadas en una centrifuga aproximadamente por 40 min a temperatura y velocidad máxima. Finalmente, las muestras se resguardaron de la luz y fueron evaluadas en un secuenciador automático.(ver cuadro 11 y 12).

RESULTADOS

I. AISLAMIENTO VIRAL:

A. Embrión de Pollo.

En el segundo pase ciego se obtuvieron lesiones características de los Herpesvirus como pústulas blanquecinas, edema y hemorragia (ver figura 18).⁶²

Una vez obtenidas las lesiones, se procedió a infectar células MDBK con el virus aislado.

a. Cultivo Celular.

Se observó efecto citopático (muerte celular) en las células inoculadas con el virus sospechoso a CpHV-1 después del tercer pase ciego, a partir de las 48 horas PI. Como

testigo negativo se conservaron las células MDBK sin infectar mantenidas en las mismas condiciones que las infectadas (ver figura 19 y 20).

II. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Se observó que el citoplasma del cultivo celular exhibía numerosas vacuolas electrolúcidas de diversos tamaños y con escaso material fibrilar electrodensito. Asimismo en el citoplasma se apreciaron partículas virales con morfología icosaédrica que en ocasiones se encuentran en vacuolas y miden 130 nm, mismas que se observan emergiendo de la membrana plasmática.

En el núcleo de las células se apreciaron algunas partículas virales electrodensas con morfología semi hexagonales, las cuales median de 84 a 125 nm de diámetro, éstas se localizan entre el nucléolo y la heterocromatina que se encuentra adosada a la envoltura nuclear interna. El diagnóstico ultraestructural reporta partículas virales intranucleares e intracitoplasmáticas compatibles con herpesvirus (ver figura 21,22 y 23).

III. IDENTIFICACIÓN VIRAL

III.I INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA

Se puede observar en las figuras 24, 25, 26, 27 y 28 que la tinción por IF indirecta muestra una reacción positiva (color verde claro/amarillento) en células infectadas con el virus CpHV-1 a las 72 y 100 horas.

En la figura 25 se muestra la ausencia de reacción (negativa, fondo negro) en las células MDBK testigo, que fueron tratadas bajo las mismas condiciones que las células infectadas.

Después de observar la prueba de inmunofluorescencia se procedió a teñir las células MDBK con una tinción cromática para evidenciar la integridad del monoestrato (Figura 26).

III.II PCR gC INICIADORES EXTERNOS.

Se obtuvo una única banda de 600 pb tanto en la PCR con ADN sospechoso a CpHV-1 como en la PCR con DNA de BoHV-1. Al ser ambos aislamientos de campo (CpHV-1 y BoHV-1) se tomó la decisión de secuenciar esta banda a pesar de no corresponder al peso esperado (ver figura 31).

III.III SECUENCIACIÓN

En los resultados obtenidos de la secuenciación no se logró identificar al CpHV-1. La secuencia obtenida era compatible con *Escherichia coli*.

Clona 5.

```
GGMSAWYTTKWGCTGACACGGCTGGAACTGGAGGCTAAATGACGCCAGGTGAAGTACGGCGT
TATATTTTCATCATTGCACTTTTTTAAGCTACGGACTTGATGAACTGATCCCCAAAATGCGTATCACC
CTGCCGCTACGGCTATGGCGATACTCATTATTCTGGATGCCAAATCGGCATAAAGACAAACTTTTAG
GTGAGCGACTACGATTGGCCCTGCAAGAACTGGGGCCGTTTGGATCAAGTTCGGGCAAATGTTA
TCAACCCGCCGCGATCTTTTTCCACCGCATATTGCCGATCAGCTGGCGTTATTGCAGGACAAAGTTG
CTCCGTTTGATGGCAAGCTGGCGAAGCAGCGGATTGAAGCTGCAATGGGCGGCTTGCCGGTAGAA
GCGTGGTTTGACGATTTTGAAATCAAGCCGCTGGCTTCTGCTTCTATYKYCCAGGTTTCATACCGCGC
GATTGAAATCGAATGGTAAAGAGGTGGTGATTAAGCCATCCGCCCGGATATTTTGCCGGTTATTA
AAGCGGATCTGAACTTATCTACCGTCTGGCTCGCTGGGTGCCGCGTTTGCTGCCGGAGTTCTCCG
TCACAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTG
GATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGT. (ver figura 32)
```

Clona 8.

```
GGCWSCKATGWGCCTGACACGGCTGGAACTGGAGGCTAAATGACGCCAGGTGAAGTACGGCGT
TACTTTTCATCATTGCACTTTTTTAAGCTACGGACTTGATGAACTGATCCCCAAAATGCGTATCACC
TGCCGCTACGGCTATGGCGATACTCATTATTCTGGATGCCMAATCGGCATAAAGACAAACTTTTAG
```


GTGAGCGACTACGACTGGCCCTGCAAGAAGCTGGGGCCGGTTTGGATCAAGTTCGGGCAAATGTTA
TCAACCCGCCGCGATCTTTTTCCACCGCATATTGCCGATCAGCTGGCGTTATTGCAGGACAAAGTTG
CTCCGTTTGATGGCAAGCTGGCGAAGCAGCAGATTGAAGCTGCAATGGGCGGCTTGCCGGTAGAA
GCGTGGTTTGACGATTTTCAAATCAAGCCGCTGGCTTCTGCTTCTWTCKCCCAGGTTTCATACCGCGC
GATTGAAATCGAATGGTAAAGAGGTGGTGATTAAGTCATCCGCCCGGATATTTTGCCGGTTATTA
AAGCGGATCTGAAACTTATCTACCGTCTGGCTCGCTGGGTGCCGCGTTTGCTGCCGGAGTTCTCCG
TCACAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTG
GATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGT. (ver figura 33)

Clona12

GGCSATYKCKWGCTGACACGGCTGGAAGCTGGAGGCTAAATGACGCCAGGTGAAGTACGGCGCTTA
TATTTTCATCATTGCACTTTTTTAAGCTACGGACTTGATGAACTGATCCCCAAAATGCGTATCACCT
GCCGCTACGGCTATGGCGATACTCATTATTCTGGATGCCAAAWCGGCATAAAGACAAACTTTTAGG
TGAGCGACTACGACTGGCCCTGCAAGAAGCTGGGGCCGGTTTGGATCAAGTTCGGGCAAATGTTAT
CAACCCGCCGCGATCTTTTTCCACCGCATATTGCCGATCAGCTGGCGTTATTGCAGGACAAAGTTGC
TCCGTTTGATGGCAAGCTGGCGAAGCAGCAGATTGAAGCTGCAATGGGCGGCTTGCCGGTAGAAG
CGTGGTTTGACGATTTTCAAATCAAGCCGCTGGCTTCTGCTTYTWYKYCAGGTTTCATACCGCGCG
ATTGAAATCGAATGGTAAAGAGGTGGTGATTAAGTCATCCGCCCGGATATTTTGCCGGTTATTA
AGCGGATCTGAAACTTATCTACCGTCTGGCTCGCTGGGTGCCGCGTTTGCTGCCGGAGTTCTCCGTC
ACAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGG
ATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGT

DISCUSIÓN

En este trabajo se buscaba identificar al agente causal de la vulvovaginitis y balanopostitis presente en el rebaño caprino de la FMVZ UNAM ubicado en el municipio de Tequisquiapan Querétaro México, donde se observó microscópicamente la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares (CIIN) eosinofílicos, sugiriendo una infección de tipo herpesviral ocasionada por el CpHV-1.

Un posible diagnóstico diferencial de esta enfermedad es *Mycoplasma agalactiae*, ya que se ha reportado su asociación a vulvovaginitis en cabras⁶³. Sin embargo, en este trabajo no se consideró a dicho agente como un posible causal de la enfermedad debido a la evidencia de partículas virales sugerentes a la familia *Herpesviridae* en las fotografías de microscopía electrónica tomadas a partir del cultivo celular. Además, los CIIN eosinofílicos observados en la histopatología también sugirieron la infección con este mismo virus.²².

Un segundo diagnóstico diferencial es un virus perteneciente a la familia *Poxviridae* género *parapoxvirus* causante de la enfermedad de ectima contagioso, responsable de lesiones ulcerativas en el ganado caprino.^{64,65,66} Este fue desestimado debido a los resultados en la microscopía electrónica (que no coinciden con esta familia viral), además del efecto que causaría en el embrión de pollo y cultivo celular, como se explica a continuación:

Se considera a los parapoxvirus incapaces de replicarse en embrión de pollo, lo que marca una importante diferencia con los orthopoxvirus⁶⁷. Se ha utilizado a la membrana corioalantoidea con la finalidad de replicarlo y en algunos casos positivos, se presentan lesiones que corresponden a pequeñas placas opacas de menos de 0.5 mm muchas veces no observables a simple vista.⁶⁶ En cuanto al cultivo celular el virus se replica en BHK-21 y PK15 y produce redondeamiento y desprendimiento de las células del monoestrato; además, pueden observarse cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos y células binucleadas de mayor tamaño.^{68,69}

El encontrar pústulas en las membranas corioalantoideas de los EP inoculados con el aislamiento, sugiere una infección de tipo herpesviral, ya que ésta es una lesión

característica en estos virus⁶². Además, como se mencionó anteriormente el efecto citopático encontrado corresponde a lo reportado en cultivos celulares infectados con herpesvirus, particularmente haciendo referencia al CpHV-1.⁷⁰ Otros virus podrán dar este efecto, pero la suma de todos los hallazgos anteriores indica que el diagnóstico puede enfocarse a un herpesvirus de rumiantes. Sin bien existen pocos estudios que demuestren la habilidad de dichos virus para cruzar la barrera inter-especie, hay evidencia experimental que sugiere que el BoHV-1 puede infectar cabras,^{71,72} por lo que era necesario demostrar que no solamente se trataba de un herpesvirus, sino hacer el diferencial con BoHV-1.

Para demostrar que el aislamiento obtenido efectivamente correspondía a CpHV-1 se decidió emplear 2 métodos diferentes: una prueba serológica (IF) y una molecular (PCR).

En la IF se detectó una reacción positiva utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra la gC del virus. Dichos anticuerpos se probaron en un estudio previo en el que se demostró su especificidad al no presentar reactividad cruzada contra otros herpes virus de rumiantes⁵⁹. Es importante señalar que cuando se realizó la prueba en el presente estudio se incluyeron dos testigos: un cultivo celular de la línea MDBK sin infectar y un cultivo infectado con el BoHV-1, obteniendo en ambos casos un resultado negativo. Hubiera sido deseable utilizar anticuerpos monoclonales contra IBR, para demostrar que el aislamiento obtenido resultaba negativo a éste, desafortunadamente no contamos con dicho anticuerpo en el laboratorio. Lo anterior sugiere que el aislamiento obtenido de las lesiones de las cabras afectadas podría corresponder a un herpesvirus caprino. Sin embargo, habría que corroborarlo con la prueba molecular.

Aunado a lo anterior, en otro trabajo que se está realizando con muestras de animales obtenidas del mismo rancho del que se hizo el aislamiento en este trabajo, se ha logrado detectar la presencia del virus en al menos una de ellas.⁷³ En el citado trabajo se obtuvieron bloques de parafina que contenían secciones de hígado, pulmón, bazo e intestino de animales con signología sugerente a la infección por CpHV-1, para buscar la identificación del antígeno viral empleando la técnica de inmunohistoquímica estreptoavidina-biotina-peroxidasa, y los anticuerpos monoclonales usados para la IF del presente trabajo. Esto sugiere, que el virus aislado a partir del prepucio de un macho sospechoso a la enfermedad, también está presente en algunas lesiones de los animales de ese rancho.⁷³

Refiriéndonos a la segunda ruta planteada en la identificación del CpHV-1: la biología molecular, podemos decir que no fue posible demostrar por esta técnica que el aislamiento corresponde a un CpHV-1. Lo anterior sin embargo, tampoco indica que el virus no está presente, sino que pudo deberse a una falla en la estandarización o estrategia para su identificación molecular. La principal problemática para cumplir con esta meta 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.

Por lo anterior, se consideró la estrategia de realizar una PCR anidada con un primer juego de iniciadores que amplifica una región de la gC tanto de virus bovino como caprino, para posteriormente re-amplificar con dos diferentes juegos de iniciadores: uno específico para virus de bovino y el otro para caprino. Si bien ésta parecía ser la forma más sencilla de hacerlo, ya que se podría contar un herpesvirus bovino BoHV-1 para su estandarización, el

elevado porcentaje de guanina citocina (%g-c) que conforman a las secuencia genómicas de la gC en los alphaherpesvirus de rumiante generó un alto grado de inespecificidad en la prueba.^{74,75}

De acuerdo a los resultados obtenidos en la estandarización de la técnica, se observó una banda única de 600 pb, tanto en el ADN sospechoso a CpHV-1, como en el ADN de BoHV-1. Si bien, este no fue del peso esperado, ambas muestras provenían de asilamientos de campo por lo que consideramos que podría haber existido alguna inserción, esto basado en la diferencia reportada de 133 pb en la glicoproteína C entre las dos cepas caprinas de referencia: la cepa suiza e italiana.^{76,77} Por lo anterior, se decidió recortar dicha banda con la finalidad de secuenciarla y corroborar si correspondía a CpHV-1. Sin embargo, la secuencia obtenida no alineó con ningún herpesvirus reportado y si lo hizo con *E. coli*. Se considera que los iniciadores no resultaron específicos y que probablemente los ADN's obtenidos para correr esta prueba se encontraran contaminados con ADN de *E. coli*. No fue posible repetir esta prueba con otra muestra de ADN; esto no se realizó por falta de tiempo y recursos.

Por otro lado, se consideró que pudo haber fallado la amplificación de esta región debido a que se ha reportado que existe recombinación entre los α -herpesvirus^{78,10}, esto podría haber generado cambios en la secuencia a amplificar evitando que los iniciadores pudieran alinearse al sitio esperado.

Si bien el segundo objetivo de este trabajo no pudo cumplirse, los hallazgos encontrados en la microscopía electrónica, la lesión en embrión de pollo y el efecto citopático hacen

suponer que se trata de un herpesvirus. Por otro lado, la inmunofluorescencia con los anticuerpos monoclonales, indicaría que podría tratarse de un CpHV-1 y que deberán plantearse otras estrategias para su identificación molecular. Dentro de ellas podemos destacar las siguientes:

1) Replicar mayor cantidad de virus, para hacer su purificación mediante gradiente de sacarosa. Esto permitiría tener suficiente material biológico como para realizar una microscopía electrónica con tinción negativa, prueba que no se pudo realizar en el presente estudio debido a que el cultivo enviado a microscopía tenía poca carga viral. Además, teniendo mayor cantidad de virus, se podría obtener suficiente ADN para realizar cortes con enzimas de restricción y demostrar que éste corresponde a un α -Herpesvirus de rumiante comparándolo con lo ya reportado.⁹

2) Diseñar otra estrategia para su identificación molecular utilizando iniciadores específicos para la gB α -herpesvirus. Si bien, éstos no distinguirían entre CpHV-1 y BoHV-1, permitirían demostrar que es un herpesvirus de rumiante, para posteriormente hacer la diferenciación entre ambos. Este enfoque tendría la ventaja de que esta glicoproteína es de las más abundantes y conservadas entre los herpesvirus de rumiantes^{7,8,11,13,10}. Cabe señalar que esta región presenta menos mutaciones por lo que disminuiría la posibilidad de que los iniciadores no alinearan con la cepa de campo^{7,8,11}. Una vez identificado que el aislamiento corresponde a un herpesvirus de rumiantes se podría secuenciar esta región y alinearla con las ya reportadas para ambos virus. En este sentido, aunque ambas glicoproteínas B son altamente conservadas la más alejada filogenéticamente entre herpesvirus de rumiantes es la del CpHV-1.^{17,18}

3) Realizar un estudio a partir del cultivo celular empleando la metagenómica. La metagenómica 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 a bajo costo.^{79,80,81,82} Es un campo nuevo en el que se persigue obtener secuencias del genoma de los diferentes microorganismos, extrayendo y analizando su ADN de forma global. La factibilidad de secuenciar directamente sus genomas abre nuevas posibilidades que suponen un cambio de rumbo en la Microbiología. En nuestro caso podríamos usar este enfoque con muestras de membranas corioalantoideas infectadas o con cultivos celulares, eliminando la necesidad de diseñar iniciadores específicos^{79,80,81,82}.

Hasta ahora las pruebas de PCR y el Ensayo de Restricción Enzimática (REA) eran los únicos métodos disponibles para el diagnóstico y la diferenciación entre el CpHV-1 con el resto de los alphaherpesvirus de rumiante. Sin embargo, con la obtención de anticuerpos monoclonales específicos contra el CpHV-1 se abre una nueva herramienta complementaria a la identificación específica del virus, particularmente en pruebas como la IF, IHQ o la ELISA competitiva anti-gC. Lo anterior significaría una potencial estrategia diagnóstica en la detección de animales infectados, con la ventaja de ser métodos fáciles de realizar y de bajo costo.

CONCLUSIONES

En la prueba de inmunofluorescencia indirecta se detectó una reacción positiva en las células infectadas con el virus sospechoso a CpHV-1. Sin embargo, no se logró la identificación molecular del CpHV-1 aislado del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en el Altiplano, por lo que se rechaza la hipótesis planteada en este trabajo.

FIGURAS

Figura 1. Modelo de Herpesvirus tipo 1.⁷

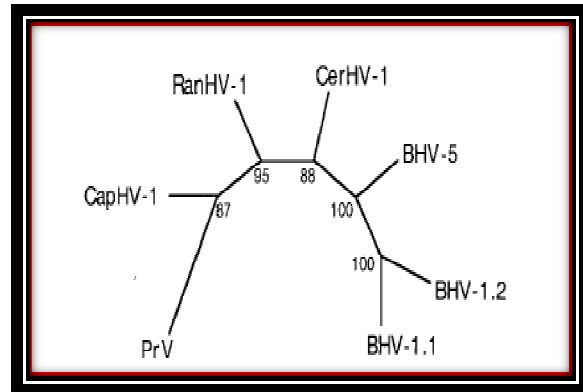
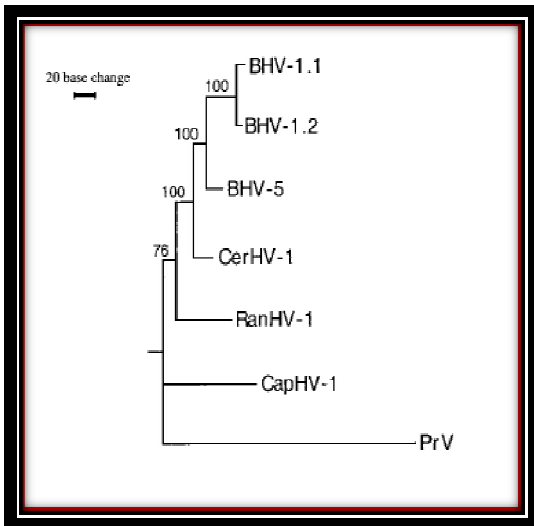
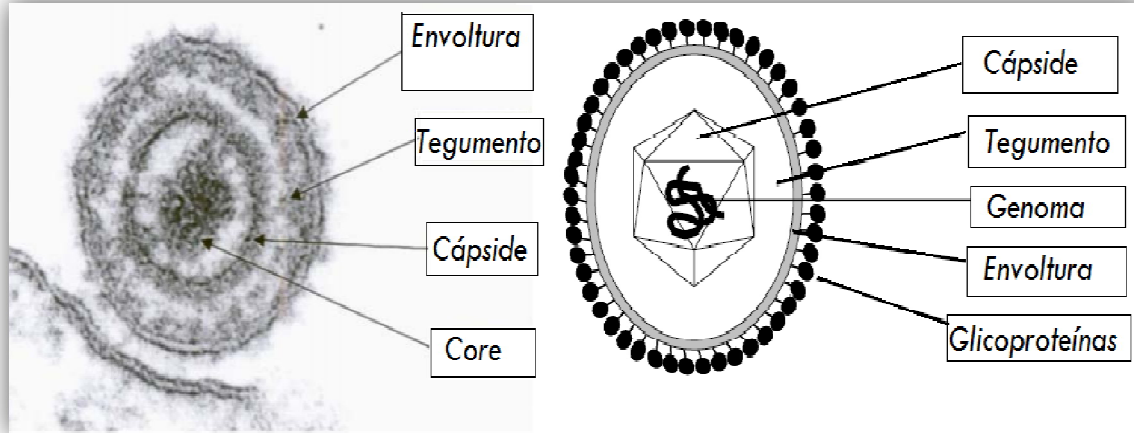


Figura 2. Árbol filogenético de los 5 *alphaherpesvirus* de rumiantes¹⁸

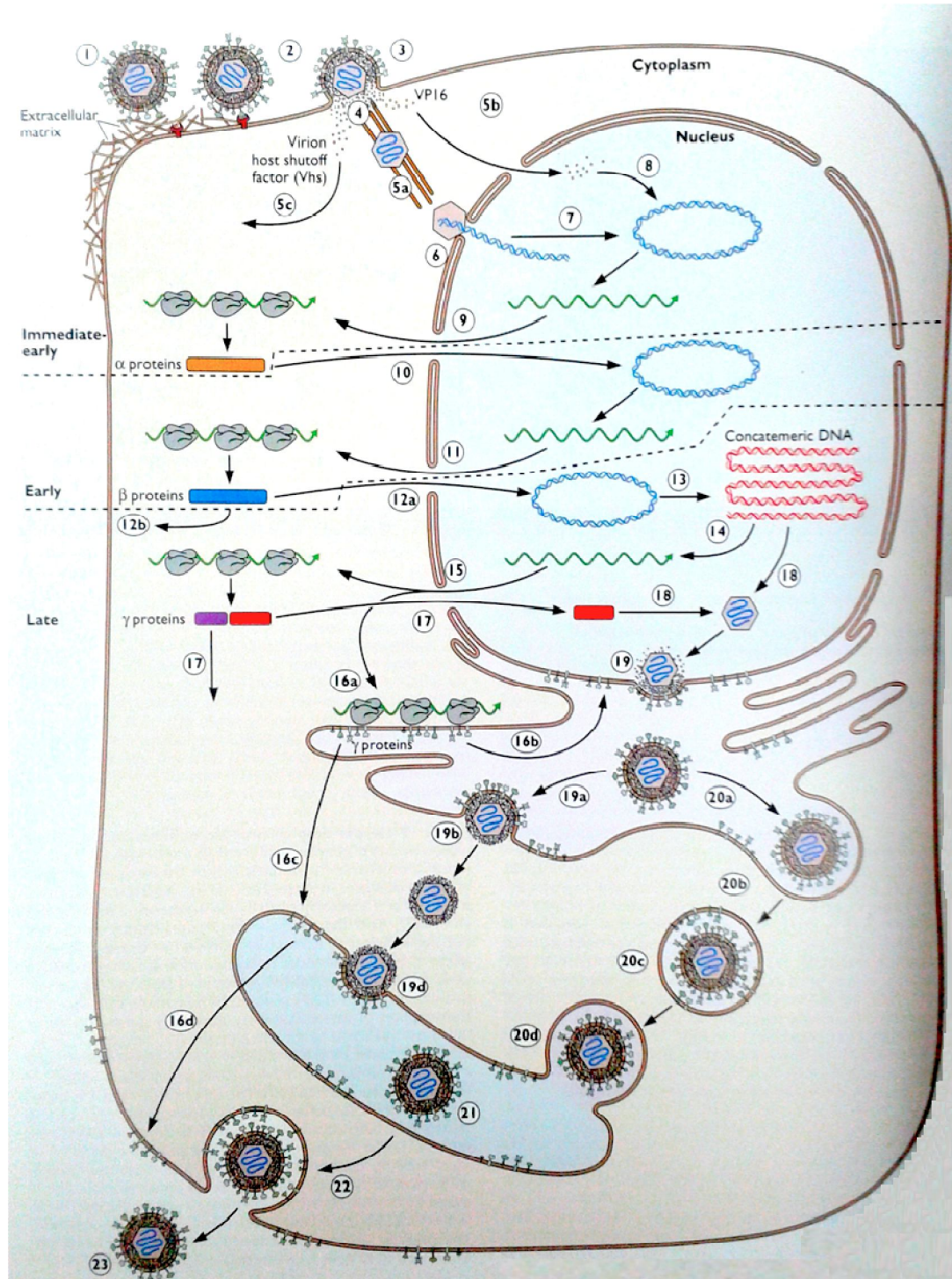


Figura 3. Ciclo de Replicación del Herpesvirus tipo 1

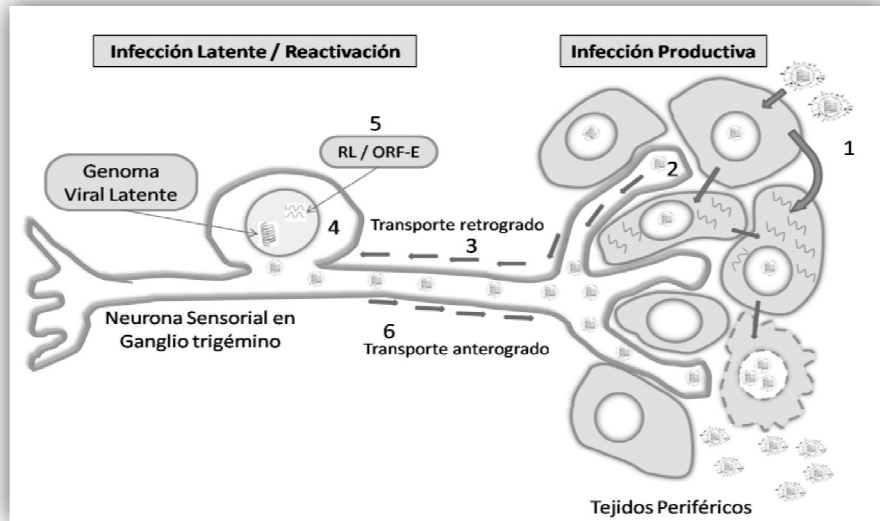


Figura 4. Modelo de transporte axonal del BoHV-1. Luego de la infección primaria (1) el virus invade las terminales sensoriales de las neuronas (2), a través de las cuales las nucleocápsides ascienden por transporte axonal retrogrado (3) al cuerpo celular neuronal dentro del ganglio (4), en el cual establece 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.⁵⁵

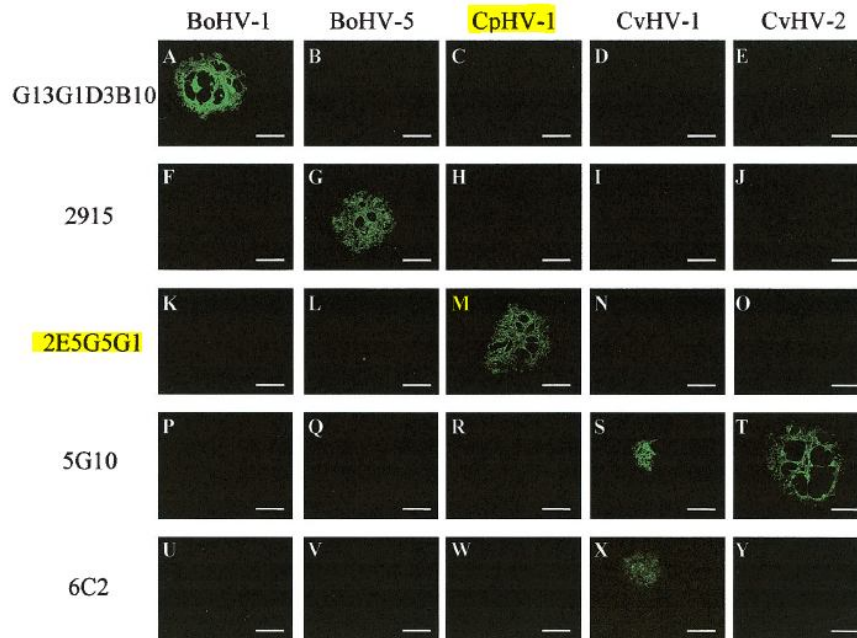


Figura 5. Inmunofluorescencia Indirecta en células MDBK infectadas con BoHV-1 (A, F, K, P y U), BoHV-5 (B, G, L, Q y V), CpHV-1 (C, H, M, R y W), CvHV-1 (D, I, N, S y X), y CvHV-2 (E, J, O, T y Y). G13G1D3B10 (A a la E), 2915 (F a J), 2E5G5G1 (K a O), 5G10 (P a T), y 6C2 (U a Y). Todas las tinciones por inmunofluorescencia fueron repetidas tres veces. Bars, 200 μ m.



Figura. 6. EP inoculado con el virus sospechoso a CpHV-1

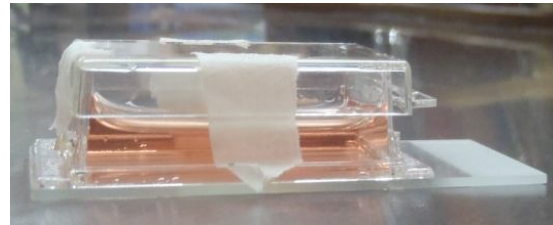
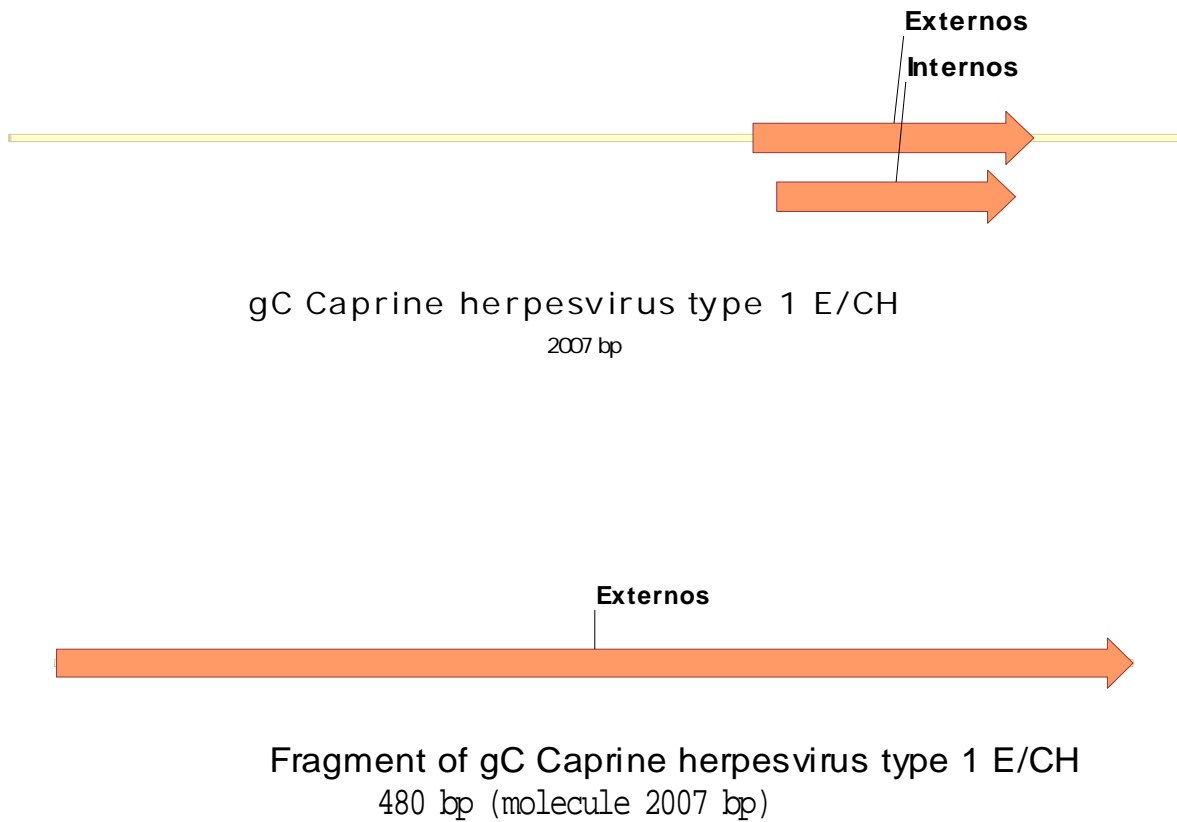


Figura 7. Cámaras Lab-Tek utilizadas para IF.



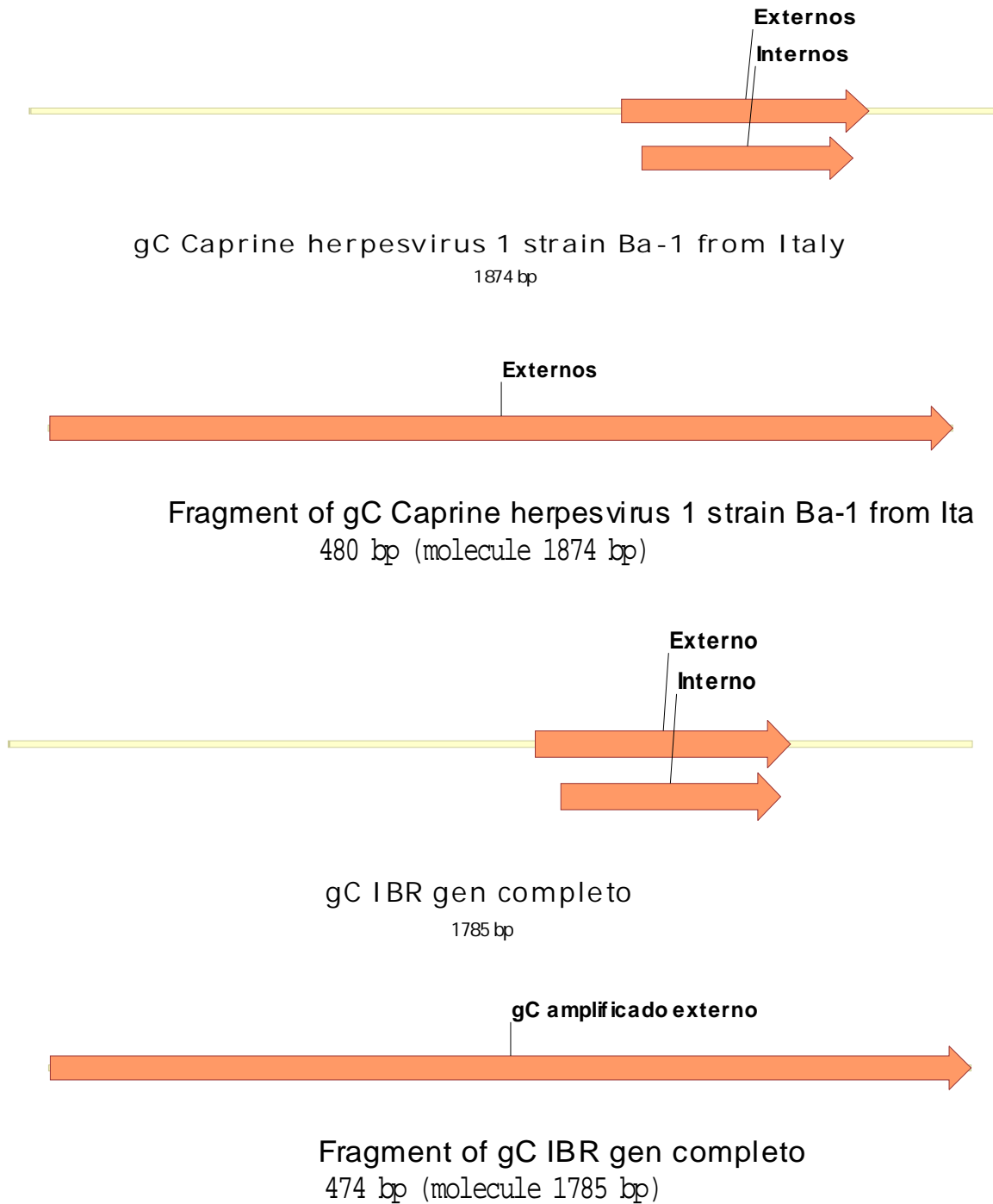
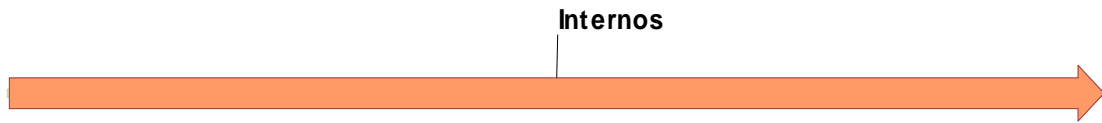
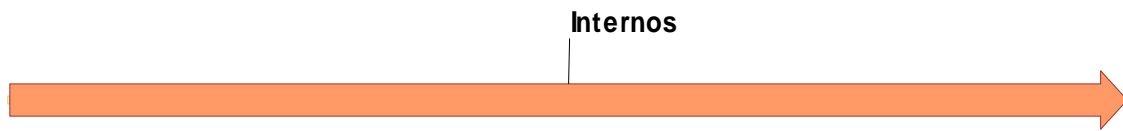


Figura 8. Iniciadores Externos. Juego 1: Secuencia amplificada de 480 pb para CpHV-1 y 474 pb para BoHV-1. En este esquema de amplificación se toman como referencia las dos cepas reportadas del CpHV-1: la cepa de Suiza (E/CH) y la cepa Italiana (Ba-1).

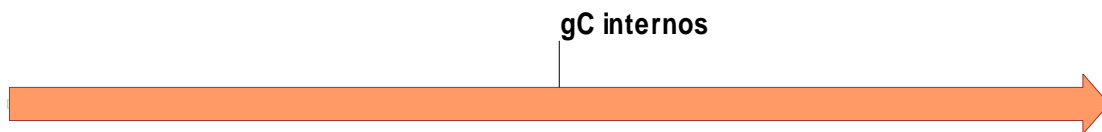


Fragment of gC Caprine herpesvirus type 1 E/CH
410 bp (molecule 2007 bp)



Fragment of gC Caprine herpesvirus 1 strain Ba-1 from Ita
410 bp (molecule 1874 bp)

Figura 9 . Juego 2: Iniciadores anidados específicos para CpHV-1. Secuencia amplificada de 410 pb tanto para la cepa Suiza como la Italiana.



Fragment of gC IBR gen completo
408 bp (molecule 1785 bp)

Figura 10 .Iniciadores específicos para BoHV-1. Juego 3: Secuencia amplificada 408 pb.

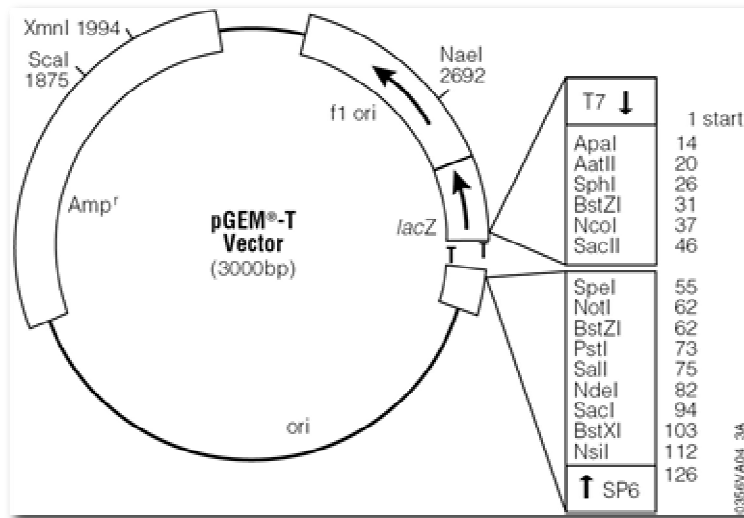


Figura 11. Vector pGEM-T

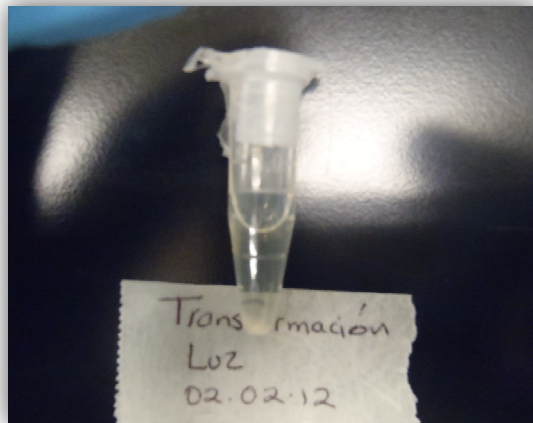


Figura 12. Transformación bacteriana

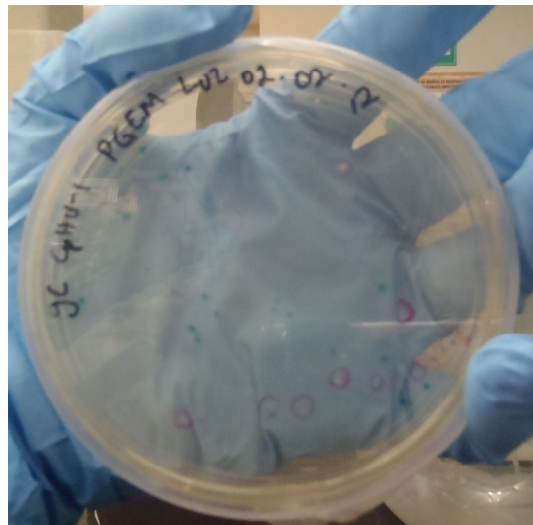


Figura 13. Medio LB, ampicilina, Xgal, IPTG, donde se muestra la presencia de colonias azules (no recombinantes) y blancas (recombinantes).

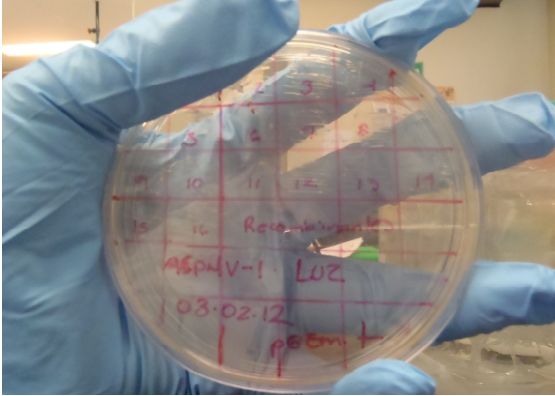


Figura 14. Medio LB ampicilina donde se sembraron las de 16 colonias blancas.

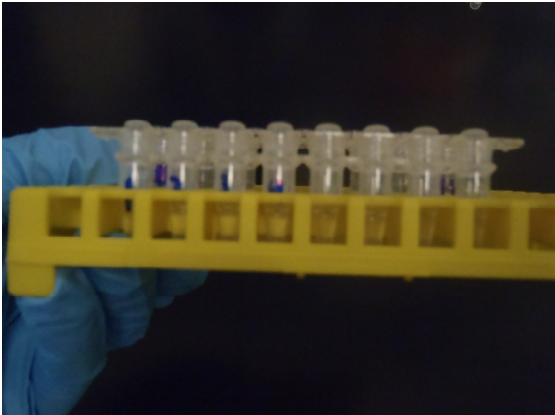


Figura 15. Tubos de PCR estériles donde se corrió la PCR para identificar las bacterias recombinantes.

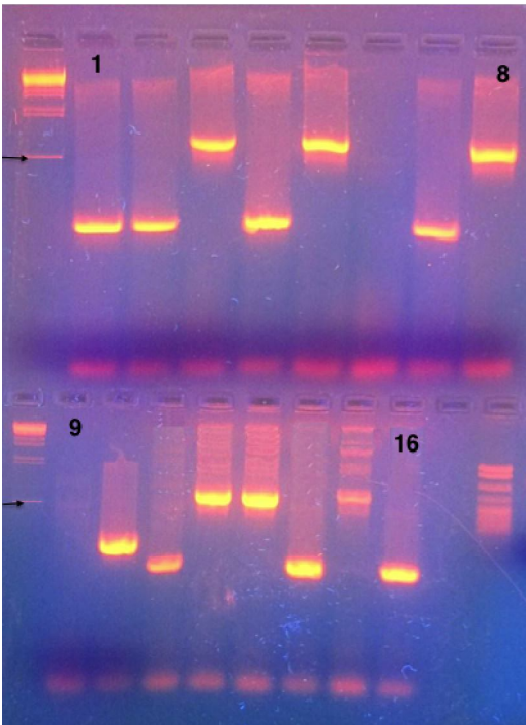


Figura 16. Selección de bacterias recombinantes, peso esperado 838 pb.

Primer carril izquierdo en ambos niveles: Marcador de Peso Lambda λ . La flecha indica el peso más bajo del marcador, correspondiente a 700 pb, por lo que se observa en esta imagen que las colonias 3,5,8,12,13 y 15 son las que corresponden al peso esperado.

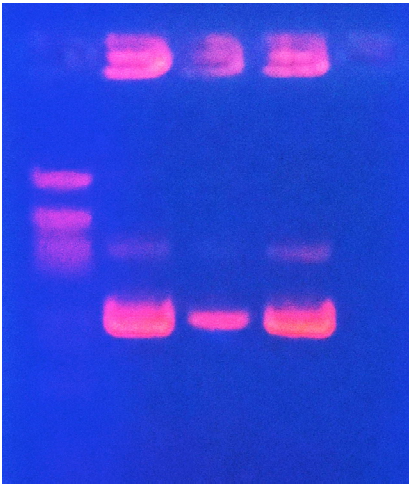


Figura 17. Plásmido clona 5, 8 y 12

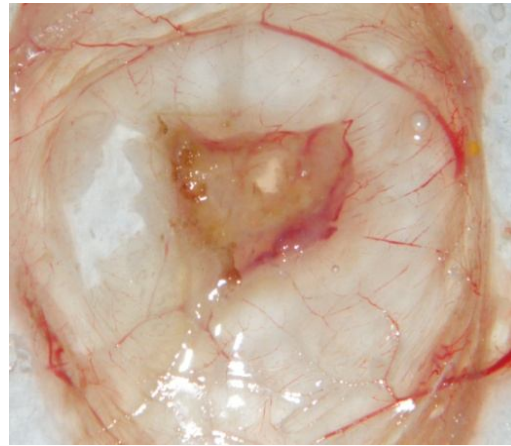
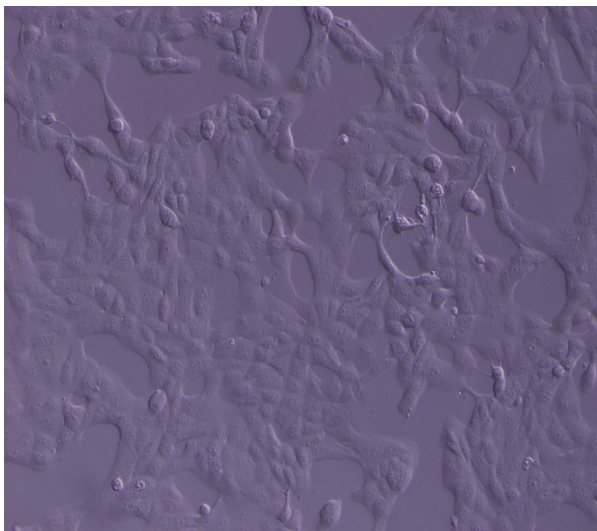


Figura 18. Pústulas en membranas corioalantoideas de EP infectados con el inóculo sospechoso a CpHV-1



19. Células MDBK 72 horas posinfección (PI)

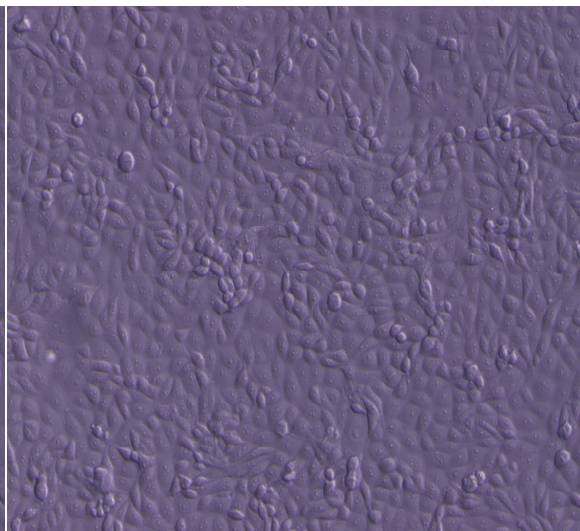


Figura 20. Células MDBK sin infectar.

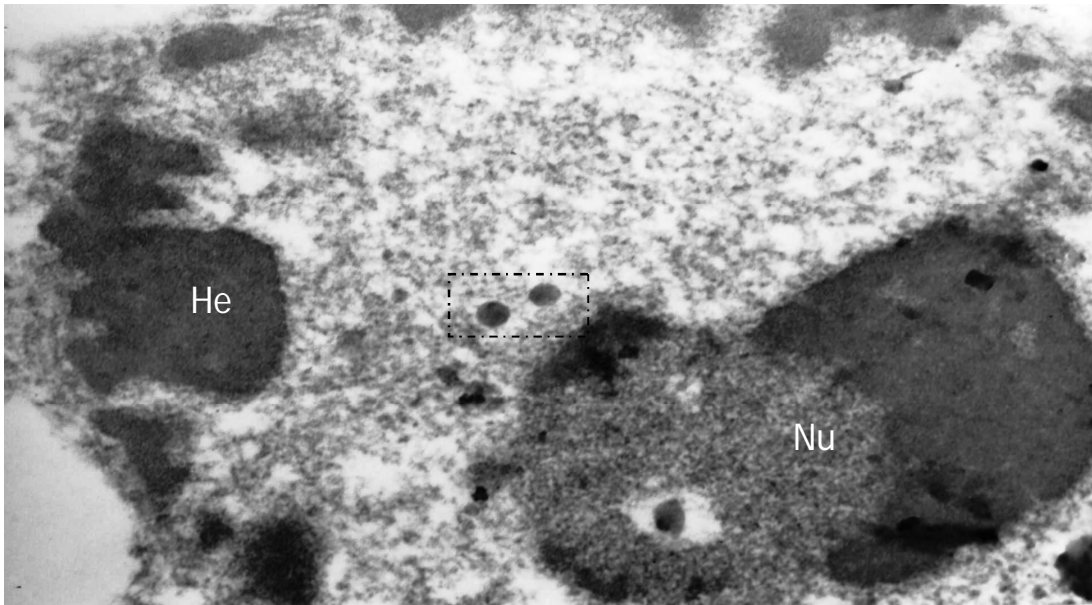


Figura 21. Fotografía electrónica de transmisión del núcleo de una célula MDBK. Se parecía adyacente al nucléolo y entre la eucromatina estructuras electrodensas semi- hexagonales de 125 nm de diámetro (recuadro). Nucléolo (Nu) eucromatina E, heterocromatina (He). Técnica de contraste general con acetato de uranilo y citrato de plomo. Aumento 20,000x

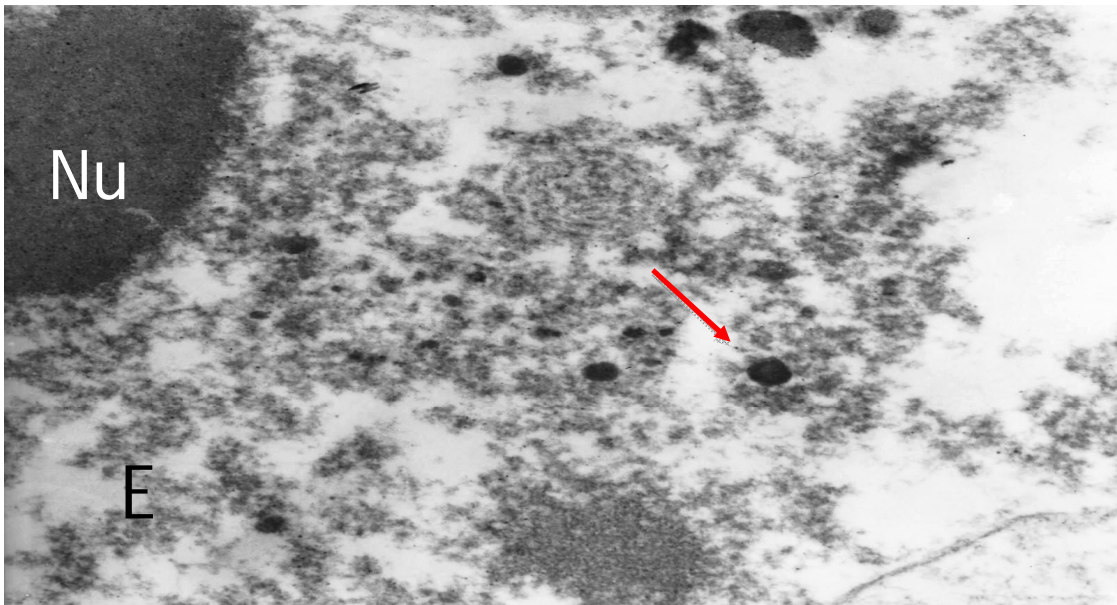


Figura 22. Fotografía electrónica de transmisión del núcleo de una célula MDBK. Se parecía adyacente al nucléolo y en la eucromatina estructuras electrodensas semi- hexagonales de 125 nm de diámetro (flecha).

Núcleo (N), nucléolo (Nu) eucromatina E. Técnica de contraste general con acetato de uranilo y citrato de plomo. Aumento 20,000x.

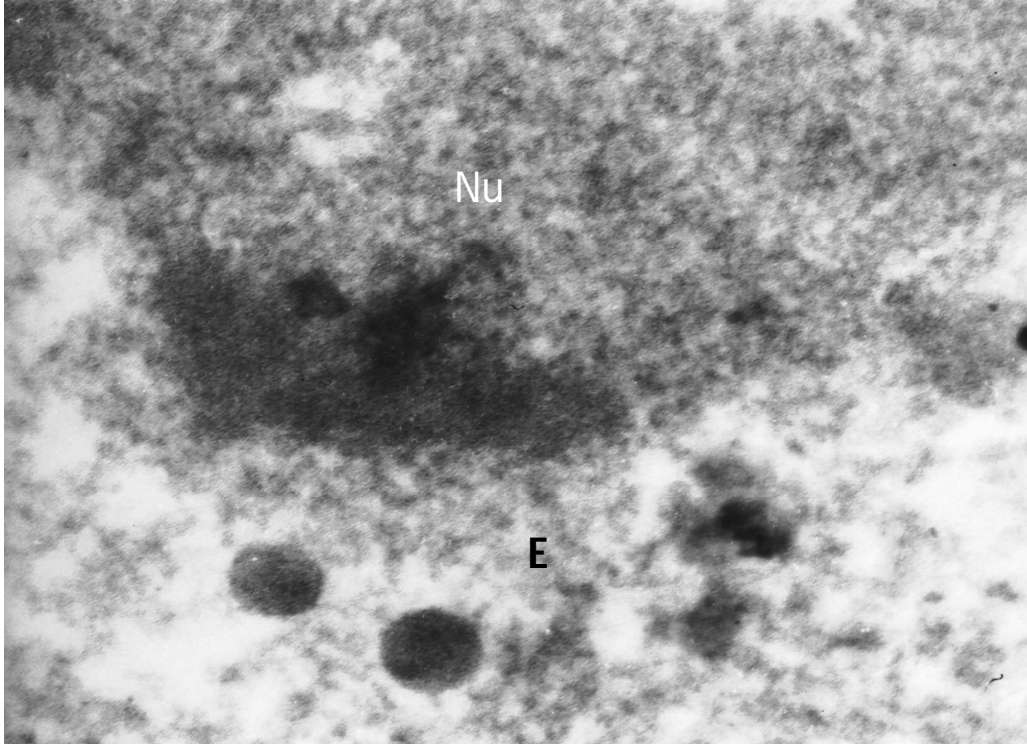
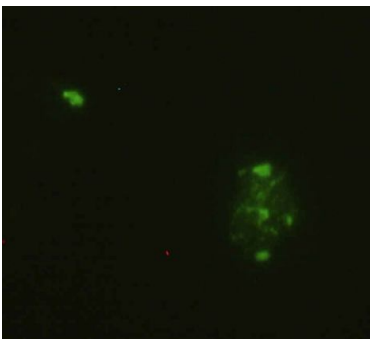
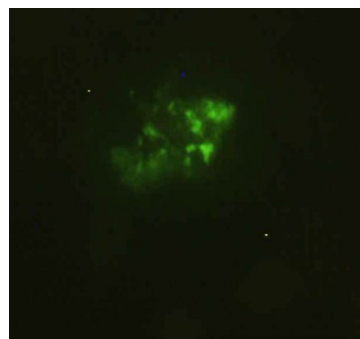


Figura 23. Fotografía electrónica de transmisión del núcleo de una célula MDBK. Nótese adyacente al nucléolo (Nu) se aprecia dos partículas virales no envueltas de 100 nm de diámetro (flecha), las cuales están inmersas en eucromatina (E). Técnica de contraste general con acetato de uranilo y citrato de plomo. Aumento 85,000x.

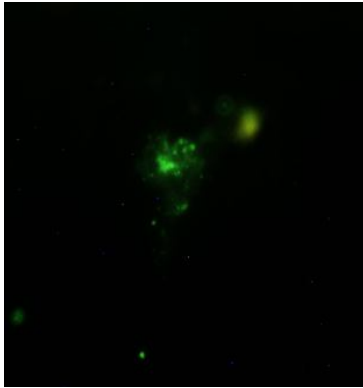


400 X (figura 24)

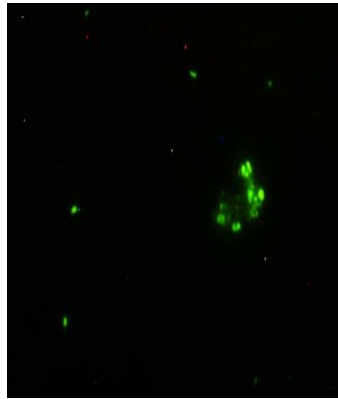


400X (figura 25)

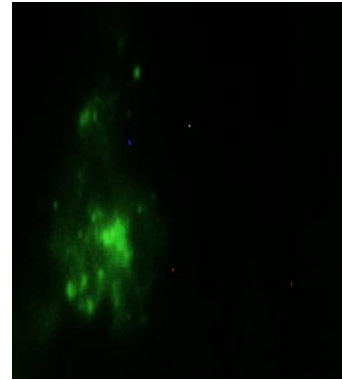
* Infección a las 72 horas



200X (figura 26)



200X (figura 27)



400X (figura 28)

- Infección a las 100 horas

Figuras 24-28. IF indirecta donde muestra una reacción positiva (color verde manzana/amarillento) en células infectadas con el virus CpHV-1 a las 72 y 100 horas.

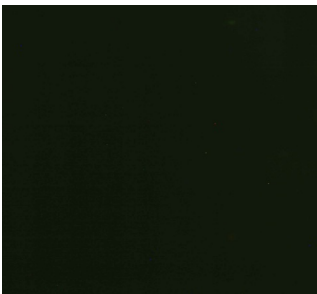
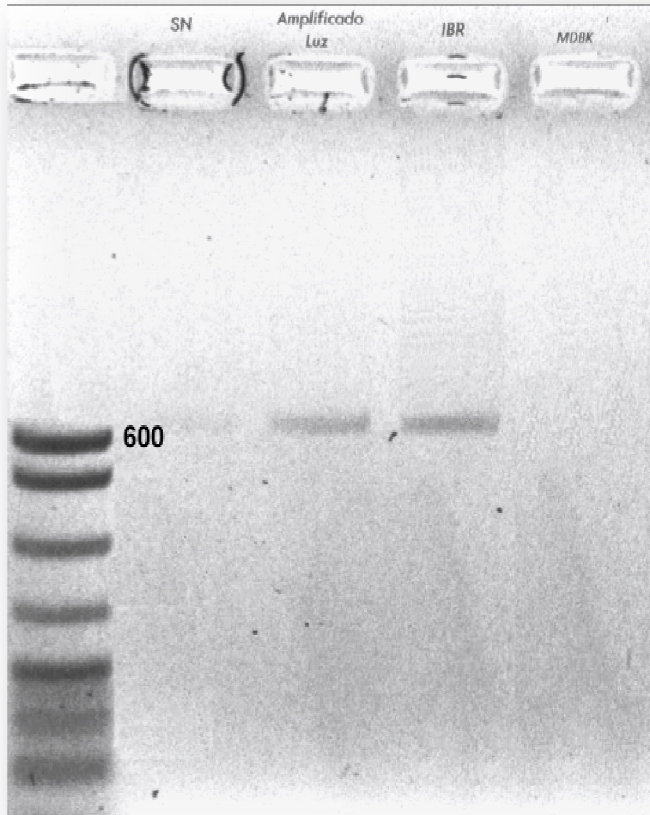


Figura 29. Testigo Negativo de células MDBK a las 72 y 100 horas (fondo negro) las células fueron tratadas bajo las mismas condiciones que las células infectadas.



Figura 30. Tinción cromática donde se observa la integridad del monoestrato.



Pozo 1. Marcador de Peso Molecular PBR
 Pozo 2. Amplificado 600 pb de Sobrenadante (SN) en infección por sospechoso a CpHV-1
 Pozo 3. Amplificado 600 pb de infección en monocapa de MDBK por virus sospechoso a CpHV-1.

Pozo 4. Amplificado 600pb BoHV-1, (testigo positivo).

Pozo 5. Testigo negativo. (PCR con ADN de células MDBK sin infectar).

Figura 31. Fragmentos 600 pb PCR externa.

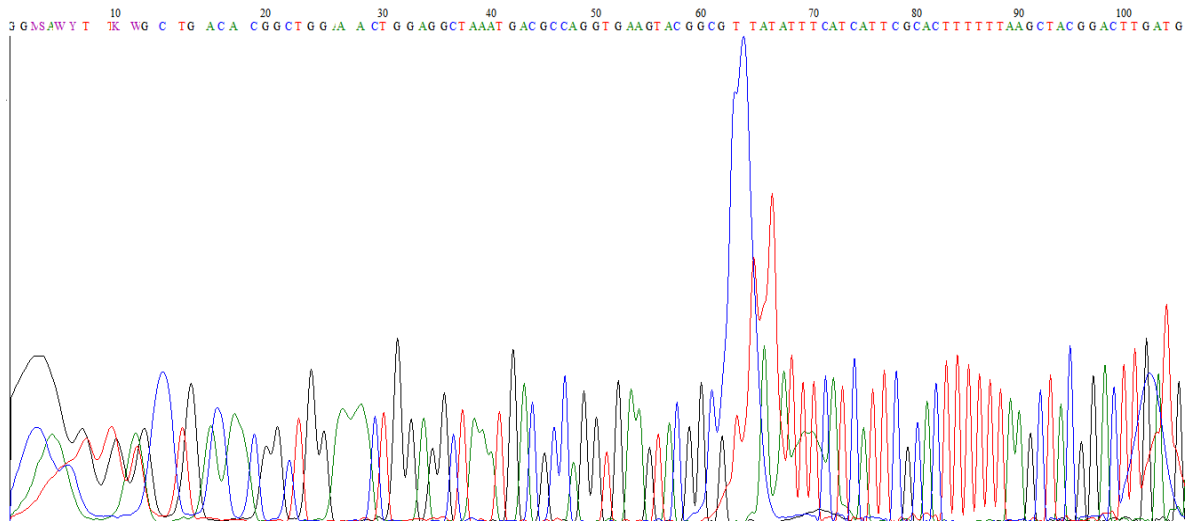


Figura 32. Clona 5

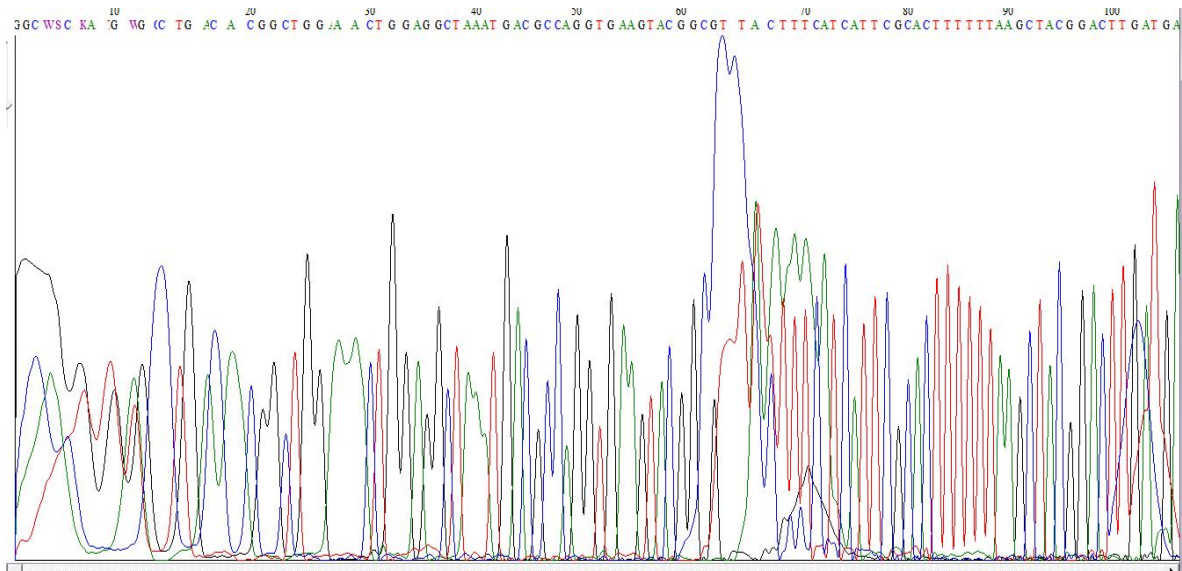


Figura 33. Clona 8

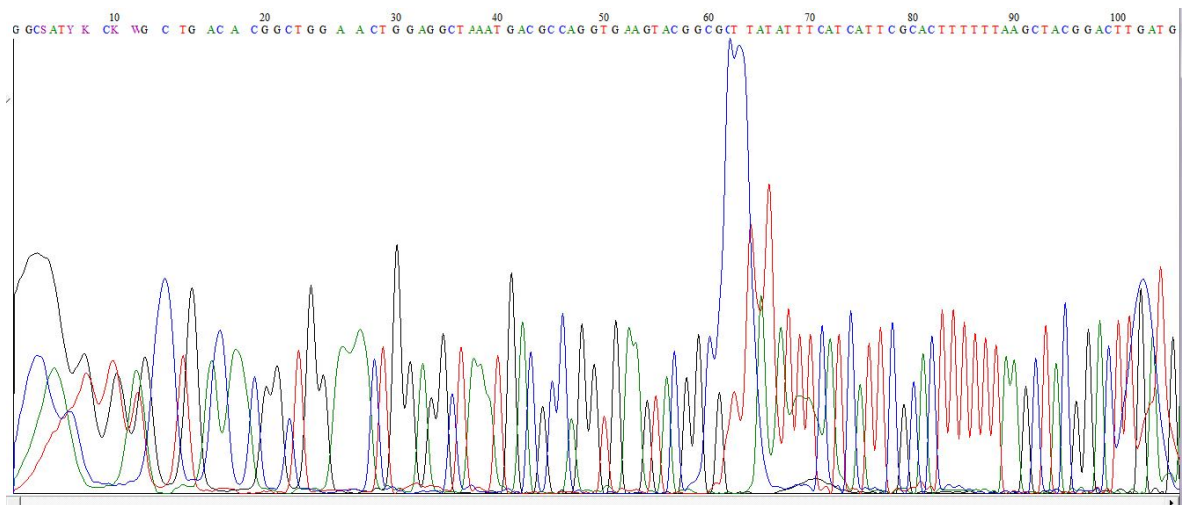


Figura 34. Clona 12

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AP012306.1	Escherichia coli str. K-12 substr. MDS42 DNA, complete genome	1007	1007	84%	0.0	98%
AP012030.1	Escherichia coli DH1 (ME8569) DNA, complete genome	1007	1007	84%	0.0	98%
CP001637.1	Escherichia coli DH1, complete genome	1007	1007	84%	0.0	98%
AP010958.1	Escherichia coli O103:H2 str. 12009 DNA, complete genome	1007	1007	84%	0.0	98%
CP001396.1	Escherichia coli BW2952, complete genome	1007	1007	84%	0.0	98%
CU928160.2	Escherichia coli IAI1 chromosome, complete genome	1007	1007	84%	0.0	98%
CP000948.1	Escherichia coli str. K12 substr. DH10B, complete genome	1007	1007	84%	0.0	98%
CP000802.1	Escherichia coli HS, complete genome	1007	1007	84%	0.0	98%
AP009048.1	Escherichia coli str. K12 substr. W3110 DNA, complete genome	1007	1007	84%	0.0	98%
U00096.2	Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655, complete genome	1007	1007	84%	0.0	98%
HE616528.1	Shigella sonnei 53G main chromosome, complete genome	1002	1002	84%	0.0	98%
AE005674.2	Shigella flexneri 2a str. 301, complete genome	1002	1002	84%	0.0	98%
CP002516.1	Escherichia coli KO11, complete genome	1002	1002	84%	0.0	98%
CP002185.1	Escherichia coli W, complete genome	1002	1002	84%	0.0	98%
AM946981.2	Escherichia coli BL21(DE3), complete genome	1002	1002	84%	0.0	98%
FN649414.1	Escherichia coli ETEC H10407, complete genome	1002	1002	84%	0.0	98%
CP001509.3	Escherichia coli BL21(DE3), complete genome	1002	1002	84%	0.0	98%
CP001383.1	Shigella flexneri 2002017, complete genome	1002	1002	84%	0.0	98%
AP010960.1	Escherichia coli O111:H- str. 11128 DNA, complete genome	1002	1002	84%	0.0	98%
AP010953.1	Escherichia coli O26:H11 str. 11368 DNA, complete genome	1002	1002	84%	0.0	98%
CP000819.1	Escherichia coli B str. REL606, complete genome	1002	1002	84%	0.0	98%
CP001665.1	Escherichia coli 'BL21-Gold(DE3)pLys AG', complete genome	1002	1002	84%	0.0	98%
CU928145.2	Escherichia coli 55989 chromosome, complete genome	1002	1002	84%	0.0	98%
AP009240.1	Escherichia coli SE11 DNA, complete genome	1002	1002	84%	0.0	98%
CP001063.1	Shigella boydii CDC 3083-94, complete genome	1002	1002	84%	0.0	98%
CP000946.1	Escherichia coli ATCC 8739, complete genome	1002	1002	84%	0.0	98%
EUS58532.1	Arabidopsis lyrata clone MITE7 transposon-insertion display band g	174	174	14%	7e-40	98%
EUS58528.1	Arabidopsis lyrata clone CACTA2 transposon-insertion display band	174	174	14%	7e-40	98%
EUS58522.1	Arabidopsis lyrata clone Gypsy21 transposon-insertion display band	174	174	14%	7e-40	98%
FN813228.1	Eimeria maxima mRNA for immune mapped protein 1 (imp-1 gene), s	172	172	13%	2e-39	100%
FNS52468.1	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTLCD2-11	172	172	14%	2e-39	97%
FNS52504.1	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTLCD2-10	171	171	13%	9e-39	99%
FNS52502.1	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTLCD2-8	171	171	13%	9e-39	99%
FNS52501.1	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTLCD2-7	171	171	13%	9e-39	99%
FNS52493.1	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTLCD1-2	171	171	13%	9e-39	99%
FNS52490.1	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTKKA2-12	171	171	13%	9e-39	99%
FNS52489.1	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTKKA2-11	171	171	13%	9e-39	99%
FNS52486.1	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTKKA2-8	171	171	13%	9e-39	99%
FNS52484.1	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTKKA2-6	171	171	13%	9e-39	99%
FNS52478.1	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTKKA1-10	171	171	13%	9e-39	99%
FNS52477.1	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTKKA1-9	171	171	13%	9e-39	99%
FNS52475.1	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTKKA1-7	171	171	13%	9e-39	99%
FNS52469.1	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTKKA1-1	171	171	13%	9e-39	99%
AM921478.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone ST_37	171	171	13%	9e-39	100%
EUS58521.1	Arabidopsis lyrata clone Gypsy20 transposon-insertion display band	171	171	13%	9e-39	99%
HE647149.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 3-L11-10m-0.8n	169	169	13%	3e-38	100%
HE647145.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 3-L03-0m-0.8mi	169	169	13%	3e-38	100%
HE647137.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 1-L03-0m-0.8mi	169	169	13%	3e-38	100%
HE660065.1	Torulaspora delbrueckii partial 26S rRNA gene, strain ZIM 2414, isol	169	169	13%	3e-38	100%
JN681269.1	Cloning vector pMono_T-vector, complete sequence	169	169	13%	3e-38	100%
HM211722.1	Uncultured rumen archaeon clone ALIQ-56 16S ribosomal RNA gene	169	169	13%	3e-38	100%
FN812775.2	Uncultured fungus genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5	169	169	13%	3e-38	100%
FNS62054.1	Uncultured Ascomycota genomic DNA containing 18S rRNA gene (p	169	169	13%	3e-38	100%
FNS62031.1	Uncultured Ascomycota genomic DNA containing 18S rRNA gene (p	169	169	13%	3e-38	100%
FNS62027.1	Uncultured Ascomycota genomic DNA containing 18S rRNA gene (p	169	169	13%	3e-38	100%
FNS52476.1	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTKKA1-8	169	169	13%	3e-38	100%

Figura 35. Blast donde se observa la compatibilidad de las secuencias obtenidas.

CUADROS

Sentido	Secuencia	# Pares de bases
gC FWD	CTGGTTTCGGAACGGCTACC	20pb
gC RVS	GTGACGGAGAACTCCGGCAG	20pb

Cuadro 1. Iniciadores externos PCR gC.

Nombre del ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
– Desnaturalización	94°C	5 min	1 ciclo
– Disociación	94°C	30 seg	35 ciclos
– Asociación	54°	30 seg	
– Extensión	72°C	30 seg	
– Extensión final	72°C	15 min	1 ciclo

Cuadro 2. Ciclos de la PCR para amplificar un fragmento de 480 pb del gen de la gC del CpHV-1

Sentido	Secuencia	# Pares de bases
gC Cap intFWD	CCGCGACGAGTTCGAGGTCAG	21 pb
gC Cap int RVS	ACCCGGCCGCCGTGCACGTG	20pb

Cuadro 3. Iniciadores internos PCR CpHV-1 gC

Nombre del ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
– Desnaturalización	94°C	5 min	1 ciclo
– Disociación	94°C	30 seg	35 ciclos
– Asociación	62°	30 seg	
– Extensión	72°C	30 seg	
– Extensión final	72°C	15 min	1 ciclo

Cuadro 4. Ciclos de la PCR para amplificar un fragmento de 410 pb del gen de la gC del CpHV-1 .

Sentido	Secuencia	# Pares de bases
gC Bov intFWD	TCTTTACGGTCGACGACTCC	21 pb
gC Bov int RVS	GCGGTGCCGGGTAGCCAGTG	20pb

Cuadro 5. Iniciadores internos PCR BoHV-1 gC

Nombre del ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
– Desnaturalización	94°C	5 min	1 ciclo
– Disociación	94°C	30 seg	35 ciclos
– Asociación	56°	30 seg	
– Extensión	72°C	30 seg	
– Extensión final	72°C	15 min	1 ciclo

Cuadro 6. Ciclos de la PCR para amplificar un fragmento de 408 pb del gen de la gC del BoHV-1 .

Reactivo	Stock	Final	Rx
Vector PGEM	50 ng/ μ L	50 ng/ μ L	1 μ L
Inserto PCR	----	9.95 ng	4 μ L
T4 ligasa	1 U/ μ L	1 U/ μ L	1 μ L
Buffer	2X	1X	5 μ L
H ₂ O	---	---	---

Cuadro 7. Reacción de ligación.

Medio de Cultivo Luria Bertani (LB)

Reactivo	1 000 ml	500 ml	300 ml	100 ml
Bacto triptona	10 g	5 g	3 g	1 g
Extracto de levadura	5 g	2.5 g	1.5 g	0.5 g
NaCl	5 g	2.5 g	1.5 g	0.5 g
1N NaOH	1 ml	0.5 ml	0.3 ml	0.1 ml
Bactor agar (en caso necesario)	10 a 15 g	5 a 7.5 g	3 a 4.5 g	1 a 1.5 g

Cuadro 8. Preparación medio LB (Luria Bertani)

Sentido	Secuencia	# Pares de bases
M13 FWD	5'-d(GTTTTCCCAGTCACGAC)-3'	17
M13 RVS	5'-d(CAGGAAACAGCTATGAC)-3'	17

Cuadro 9. Iniciadores del vector M13

Nombre del ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
Desnaturalización	94°C	5 min	1 ciclo
Disociación	94°C	30 segundos	35 ciclos
Asociación	58°	30 segundos	

Extensión	72°C	30 segundos	
Extensión final	72°C	15 min	1 ciclo

Cuadro 10. Ciclos de la PCR para la identificación de bacterias recombinantes.

Cantidad de ADN por tamaño y tipo de muestra	
Muestra	Cantidad
Producto de PCR:	
100-400pb	10-30ng
500-650pb	40-60ng
650-1000pb	70-150ng
Cadena Sencilla	100ng
Cadena Doble	150ng
Cosmido, BAC	0.5-1.0µg
ADN Bacteriano	2-3µg

Cuadro 11. Cantidad de ADN para reacción de secuenciación.

Mezcla Mínima para la Reacción de Secuencia		
Reactivo	Concentración	Volumen
Ready Reaction Premix	2.5X	2µL
Big Dye Sequencing Buffer	5X	2µL
Iniciador	-	3.2pm
ADN	-	Según ADN*
H2O	-	c.b.p.
Volumen Final	1X	20µL

Cuadro 12. Mezcla de secuenciación.

BIBLIOGRAFÍA

1 Horner GW, Hunter R, Day AM. An outbreak of vulvovaginitis in goats caused by a caprine herpesvirus. *N Z Vet J.* 1982; 30:150–152.

2 Grewal AS, Wells R. Vulvovaginitis of goats due to a herpesvirus. *Aust Vet J.* 1986; 63:79–82.

3 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

4 Piper KL, Fitzgerald CJ, Ficorilli N, Sstuddert MJ. Isolation of caprine herpesvirus 1 from a major outbreak of infectious pustular vulvovaginitis in goats. *Aus Vet J.* 2008; 86: 136-138.

5 Vanderplasschen A., Bubblot M., Pastoret P., Thiry E., Restriction maps of the DNA of cervid herpesvirus 2, two viruses related to bovine herpesvirus 1, *Arch. Virol.* 1993; 128: 379-388.

6 Buonavoglia C., Tempesta M., Cavalli A., Voigt V., Buonavoglia D., Conserva A et al. Reactivation of caprine herpesvirus 1 in latently infected goats. *Comp Immun Microbiol inf Dis* 1996; 19: 275-281.

7 Piñol, R. J., Querol M. E., Serra H. X., 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.

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

9 Keuser V., Espejo Serrano J., Schynts F., Georgin J.P., Thiry E. Isolation of caprine herpesvirus type 1 in Spain. *Veterinary Record*. 2004; 154: 395-399.

10 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.

11 Minson, A. C., Davison, A., Eberle, R., Desrosiers, R. C., Fleckenstein, B., McGeoch, D. J., et al. Family Herpesviridae, In *Virus Taxonomy Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 1a ed. San Diego. Academic Press, 2000.

12 Steven A.C, Spear P.G. Herpesvirus capsid assembly and envelopment. *Structural Biology of Viruses*. New York. 2a ed. Oxford University Press 1997.

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

14 Saito J.k., Gribble D.H., Berrios P.E., Knight H.D. and Mckercher D.G. A new herpesvirus isolation from goats: preliminary report. *American Journal of Veterinary Research*. 1974; 35: 847-848.

15 Roperto F, Pratelli A, Guarino G. Natural caprine Herpesvirus 1 (CpHV-1) infection kids. *J Comp Path*. 2000; 122: 298-302.

16 Keuser V., Espejo Serrano J., Schynts F., Georgin J.P., Thiry E. Isolation of caprine herpesvirus type 1 in Spain. *Veterinary Record*. 2004; 154: 395-399.

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

18 Ros C., Belák S. Studies of Genetic Relationships between Bovine, Caprine, Cervine, and Rangiferine Alphaherpesviruses and Improved Molecular Methods for Virus Detection and Identification. *Journal of clinical Microbiology*., 1999; 37: 1247-1253.

19 Griffin A.M. 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.

20 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.

21 Ros C., M. E. Riquelme., K.O' hman-Forslund, S. Belak. Improved detection of five closely related ruminant alphaherpesviruses by specific amplification of viral genomic sequences. *J. Virol. Methods.* 1999; 83:55–65.

22 Candanosa A.I.E., Sierra G.M., Sánchez C.A., Salas G.G., Méndez B. A., Cobos M.L et al. Vulvovaginitis y balanopostitis pustular sugerente a herpesvirus caprino-1 en cabras (Querétaro, México). *Vet. Méx.*, 2011; 42: 233-242.

23 Thiry J y Thiry E. El Herpesvirus es altamente prevalente. *Mundo Veterinario.* 2008; 214: 32-35.

24 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.

25 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.

26 EUMEDIA Redacción. El Herpesvirus Caprino es altamente prevalente. *El Mundo Veterinario.* 2008; 214: 12-15.

27 Wittels, M. & Spear, P. G. Penetration of cells by herpes simplex virus does not require a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Research.* 1990; 18: 271-29.

28 Schroder C, Keil G. M. 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.

29 Dasika D.K, Letchworth III G.J. Homologous and Heterologous Interference Requires Bovine Herpesvirus-1 gD on the Cell Surface During Virus Entry. *J Gen Virol.* 2000; 81:1041-1049.

30 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.

31 Li Y, Van Drunen Littel-Van Den Hurk S, Babiuk L.A, 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.

32 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

33 Huemer, H. P., Larcher, C., Dierich, M. P. , Falke, D. Factors influencing the interaction of herpes simplex virus glycoprotein C with the third component of complement. *Arch Virol* 1992; 127: 291

34 De Regge N., H.W. Favoreel, K. Geenen, and H.J. Nauwynck. . A homologous in vitro model to study interactions between alphaherpesviruses and trigeminal ganglion neurons. *Vet. Microbiol.* 2006; 113:251–255.

35 Friedman, H. M., G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, C. A. Seidel, and D. B. Cines. Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 acts as a receptor for the C3b complement component on infected cells. *Nature* 1984; 309:633-635.

36 Friedman, H. M., L. Wang, N. O. Fishman, J. D. Lambris, R. J. Eisenberg, G. H. Cohen, and J. Lubinski. Immune evasion properties of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC. *J. Virol.* 1996; 70: 4253-4260.

37 Lubinski J. M., 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.

38 Lubinski, J. M., Wang L., Soulika A. M., Burger R., Wetsel R. A and Friedman, H. M. Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein gC Mediates Immune Evasion In Vivo. *J. Virol.* 1998; 72: 8257-8263

39 Flint S.J., Enquist L.W., Krug R., Flint S.J., Enquist L. W., Skalka A.M, et al. Molecular Biology, Pathogenesis and Control. Principles of Virology. 2nd Edition. USA: ASM Press. 2003.

40 Hunter E. Virus Assembly. In: Knipe, DM., Howley, PM., Fields, editors. Virology. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins Press, 2001: 171-197.

41 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.

42 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.

43 Engels M., Ackermann M., Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. Veterinary Microbiology. 1996; 53: 3-15.

44 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.

45 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.

46 Winkler MT, Doster A, Jones C. Bovine herpesvirus 1 can infect CD4(+) T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle. J Virol. 1999; 73: 8657-8668.

47 Tarigan S, Webb RF, Kirkland D, Caprine herpesvirus from balanoposthitis. *Aust Vet J.* 1987; 64:321.

48 Uzal A. F., Woods L., Stillian M., Nordhausen R., Read H. D., Van Kampen H, et al. Abortion and ulcerative posthitis associated with caprine herpesvirus-1 infection in goats in California. *Vet Diagn Invest.* 2004; 16:478–484.

49 Mettler F., Engels M., Wild P., Bivetti A. Herpesvirus infection in kids in Switzerland, Schweiz. Arch. Tierheilkd. 1979; 121: 655– 662.

50 Pratelli A., Corrente M, Buonavoglia C. Tempesta M. A preliminary study on the pathogenicity of a strain of caprine herpesvirus-1. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 1999; 22: 137-143.

51 Elia G., Tarsitano E., Camero M., Bellacicco A. L., Buonavoglia D, Campolo M., et al. Development of a real-time PCR for the detection and quantitation of caprine herpesvirus 1 in goats. *Journal of Virological Methods.* 2008;148:155–160.

52 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.

53 Chénier S, Montpetit C, Hélie P. Caprine Herpesvirus-1 abortion storm in a goat herd in Quebec. *Can Vet J.* 2004; 45: 241-243.

54 Berrios PE, McKercher DG, Knight HD. Pathogenicity of a caprine herpesvirus. *Am J Vet Res.* 1975; 36:1763–1769.

55 Ruiz J., Jaime 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

56 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.

57 Miller, J.M., Van der Maaten, M.J. Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 1984; 45:790–794.

58 Lemaire, M., Schynts, F., Meyer, G., Thiry, E., 1999. Antibody response to glycoprotein E after bovine herpesvirus type 1 infection in passively immunised, glycoprotein E-negative calves. *Vet. Rec.* 144, 172–176.

59 Keuser V., Schynts F., Detry B., Collard A., Robert B., Thiry E*, et al. Improved Antigenic Methods for Differential Diagnosis of Bovine, Caprine, and Cervine Alpha herpesviruses Related to Bovine Herpesvirus 1. *Journal of Clinical Microbiology.* 2004; 42: 1228-1235.

60 Boyle J.S., Lew A.M An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends in genetics.*1995; 11: 1-18.

61 Silhavy T.J., Berman M.L., Enquist L.W. Experiments with gene fusion. Cold Spring Harbor Laboratory. 1985; 25: 350.

62 Cunningham C. H. *Virología Práctica.* 3ª ed. España: Editorial Acribia, 1990.

63 Veterinaria Uruguay VET-UY. Mycoplasmas en Pequeños Rumiantes. [Online] 2004 Marzo. Available from: URL: <http://www.vet-uy.com/articulos/ovinos/050/010/ov010bas.htm>

64 Robinson A. J., Balassu T. Contagious pustular dermatitis. Vet Bull. 1981; 51: 771-782.

65 Tórtora J. Ectima contagioso en ovinos y caprinos (Tesis de Maestría). Cuautitlán (Edo. México) México: Universidad Nacional Autónoma de México. 1985.

66 Tórtola J. Ectima contagioso de ovinos y caprinos. Ciencia Veterinaria. 1987; 4:258-282.

67 Aguilar S. A. La stomatite papuleuse bovine, diagnostic et pathogenie (Tesis Licenciatura). Liege, Bélgica. Fac. Med. Vet. Univ. Liege. 1980.

68 Torres J., Tórtota J., Hernández M., Molina A. Hernandez E. Efecto citopático del virus de ectima contagioso en cultivos primarios de células de piel y riñón ovino y caprino. XIII Congreso Nacional de Microbiología. 1982. Guanajuato, México. Universidad Nacional Autónoma de México, FEZ Cuautitlán.

69 Tórtora J., Hernández E. Demostración ultraestructural de la multiplicación del virus del ectima contagioso en la piel de conejo. XVI Congreso Nacional de Microbiología. 1985. Durango, México. Universidad Nacional Autónoma de México, FEZ Cuautitlán.

70 Longo M., Fiorito F., Marfè G., Montagnaro S., Pisanelli G. and De Martino L., Analysis of apoptosis induced by Caprine Herpesvirus 1 in vitro. Virus Research. 2009; 145: 227–235.

71 Engels, M., Palatini, A. E. Metzler, U. Probst, U. Kihm, and M. Ackermann. Interactions of bovine and caprine herpesviruses with the natural and foreign hosts. Vet. Microbiol. 1992; 33:69–78.

72 Wafula J. S., Mushi E. Z. and H. Wamwayi. Reaction of goat to infection with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Res. Vet. Sci.* 1985; 39:84–86

73 Llanos SSP, Cobos ML, Candanosa AE. Diagnóstico De Herpes Caprino CpHV-1 Por Medio De La Técnica De Inmunohistoquímica. XXI Congreso Nacional de Patología Veterinaria. 30 de mayo – 1 de junio del 2012. Guanajuato (León) México. México (León). Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, AC, Universidad Nacional Autónoma de México. 2012.

74 Sambrook. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 3^a ed. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

75 Luque J., Herráez A. *Biología Molecular e Ingeniería Genética: Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud*. 1^a ed. Alcalá España. Harcourt, 2000.

76 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/nuccore/AY821804.1>

77 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/nuccore/Z49225.1>

78 Meurens François., Keil M Günther., Muylkens Benoît., Gogev Sacha., Sandra Negro., and Etienne Thiry. Interspecific Recombination between Two Ruminant Alphaherpesviruses, Bovine Herpesviruses 1 and 5. *J. Virol.* 2004; 78: 9828–9836

79 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

80 Wooley J. C., Godzik Adam, Friedberg Iddo. A Primer on Metagenomics. *PLoS Computational Biology*. 2010; 6: 2-10.

81 Organización de los Estado Iberoamericanos para la Educación, la Ciencia y la Cultura. Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo. Divulgación y Cultura científica Iberoamericana. Metagenómica la microbiología del futuro. [Online] Available from: URL: http://www.oei.es/divulgacioncientifica/reportajes_416.htm

82 Bioinformatica. Metagenómica: Secuenciando lo desconocido Available from: URL: <http://bioinformatica.uab.es/base/documents%5CmasterGP%5CMetagen%C3%B2mica%20-%20Lara%20R.pdf>.