
Universidad Nacional de La Plata,
Facultad de Ciencias Veterinarias

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HERPES BOVINOS

Autor: Mariana Alegre

Director: Dr. Marcelo Pecoraro

Co-Director: Dr. Leandro R. Jones

Miembros del Jurado:

Dra. María Gabriela Echeverría

Dr. Victor Romanowski

Dra. Cecilia Galosi

2006

Palabras clave

PCR-M – Bovine Herpes Virus – diagnóstico – inoculaciones experimentales

Resumen

Bovine herpesvirus 1 (BHV-1) y *Bovine herpesvirus 5* (BHV-5) pertenecen a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus* [1]. BHV-1 presenta una distribución mundial; produce conjuntivitis, rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV) y balanopostitis (IBP). También se asocia a enteritis, aborto y muerte en neonatos. BHV-5 afecta a animales de entre 5 y 24 meses de edad, produciendo cuadros de meningoencefalitis generalmente mortales. En nuestro país los trabajos serológicos realizados han indicado prevalencias mayores al 40 % en todas las regiones investigadas. BHV-5 fue aislado por primera vez en 1982; aún no se conocen los aspectos epidemiológicos relacionados con la infección por este virus.

En esta tesis se realizaron inoculaciones experimentales en bovinos. Estas experiencias permitieron reproducir los síntomas clínicos característicos de BHV-1 y BHV-5, obtener especímenes para el diagnóstico de estos agentes y además, multiplicar el virus en su huésped natural. Por otro lado, se diseñó una PCR-M que utiliza *primers* específicos para cada especie viral, de manera que puede ser utilizada como herramienta diagnóstica diferencial entre ambas entidades. Se evaluaron diferentes aspectos inherentes a la capacidad diagnóstica de la técnica tales como su sensibilidad y especificidad, y además, su capacidad diagnóstica en diferentes muestras clínicas (hisopados nasales, órganos, semen). Además se analizaron 20 aislamientos de campo que habían sido previamente caracterizados mediante el uso de anticuerpos monoclonales. En todos los casos los resultados demostraron que la PCR-M desarrollada en este trabajo de tesis, puede ser utilizada como herramienta diagnóstica diferencial entre BHV-1 y BHV-5.

Este trabajo representa un nuevo aporte al estudio de las enfermedades causadas por estos virus, ya que hasta el momento BHV-1 y BHV-5 no podían ser diferenciados por los métodos de diagnóstico virológico clásicos, y tampoco existía una técnica molecular diferencial que resulte

adecuada para su uso en los laboratorios de diagnóstico.

Molecular Diagnosis of Bovine Herpesvirus

Keywords

PCR-M – Bovine Herpes Virus – diagnostic – experimental inoculations

Abstract

Bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and *Bovine herpesvirus 5* (BHV-5) are members of the genus *Varicellovirus*, which is classified in the family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae* [1]. BHV-1 presents a worldwide distribution. Infections of cattle with this agent are related to conjunctivitis, infectious bovine rhinotracheitis (IBR), infectious pustular vulvovaginitis (IPV) and balanoposthitis (IBP). It can also cause enteritis, abortion and death in newborn calves. BHV-5 affects 5 to 24 months old animals, producing fatal outbreaks of meningoencephalitis. Previous works have shown that more than 40% of cattle are seropositive against BHV-1 in Argentina. In Argentina, BHV-5 was first isolated in 1982. Epidemiological studies of BHV-5 are scarce.

In this thesis, experimental inoculations of cattle with BHV-1 and BHV-5 are described. Clinical presentation of both agents were reproduced during these experiences, which also provided specimens to be used in the PCR-method check out. The controlled trials also showed that these viruses can be multiplied in its natural host without major difficulties.

A PCR able to detect and differentiate BHV-1 and BHV-5 was developed. The technique uses specific primers against each agent. Both primer pairs were combined in a Multiplex-PCR (PCR-M). PCR-M was evaluated by the analyses of its sensitivity and specificity. The ability of the method to detect virus in different specimens (nasal swabs, organs, semen) was evaluated. Furthermore, twenty field isolates previously characterized by monoclonal antibodies were submitted to viral detection and typing by PCR-M. All the analyses showed the PCR-M would be used as a diagnostic tool against BHV-1 and BHV-5. Both species were always successfully differentiated by the PCR-M.

The present work constitutes an improvement in knowledge on bovine herpesviruses, since

classical or molecular virological methods for typing these agents were not available before. The PCR-M can be easily implemented in diagnostic laboratories with basic equipment.

Agradecimientos

A mi familia, por ayudarme a concretar mis proyectos. A Leandro Jones porque además de haberme impulsado y ayudado a realizar este trabajo, ha sido para mi un verdadero compañero y un excelente docente. A Marcelo Pecoraro por su valiosa colaboración. A la Secretaría de Ciencia y Técnica (SECyT) por el apoyo económico brindado a través del PICT 98/08-03480 y a Norberto Fondevila por haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto. A Alejandro Valera, por ser la primer persona que me enseñó a trabajar en el laboratorio, le agradezco su generosidad y compañerismo. A Laura Weber por permitirme seguir desarrollando mis actividades de posgrado mientras trabajaba en su laboratorio. A Osvaldo Zabal por la contribución que ha hecho desde su servicio a mi trabajo. A todos los compañeros que he tenido en estos años. Al Instituto de Virología del INTA Castelar y sus autoridades por haberme brindado mi lugar de trabajo.

Índice general

Índice de tablas	IX
Índice de Figuras	X
Abreviaturas	XI
1. Generalidades	1
1.1. Introducción	1
1.2. Taxonomía de la familia <i>Herpesviridae</i>	4
1.3. Herpes Virus Bovinos 1 y 5.	6
1.3.1. Morfología y genoma viral	6
1.3.2. Propiedades fisicoquímicas	8
1.3.3. Ciclo viral	8
1.4. Enfermedades producidas por BHV-1 y BHV-5	10
1.4.1. Patogenia y síntomas clínicos	10
1.4.2. Latencia	12
1.4.3. Epizootiología	13
1.4.4. Respuesta inmune	14
1.5. Importancia económica	16
1.6. Epidemiología	17
1.6.1. Situación epidemiológica de BHV a nivel mundial	17
1.6.2. Situación de BHV-1 y BHV-5 en Argentina	18
1.7. Diagnóstico virológico	19
1.7.1. Generalidades del diagnóstico virológico	19
1.7.2. Diagnóstico de las enfermedades producidas por BHV	21
1.7.3. Diagnóstico molecular	21
1.8. Reacción en Cadena de la Polimerasa	22
1.8.1. Principios de la PCR	22
1.8.2. Variantes de la PCR más aplicadas en el diagnóstico virológico	23
1.9. Hipótesis y Objetivos	25
2. Materiales y Métodos	26
2.1. Obtención de material biológico	26
2.1.1. Inoculaciones experimentales en bovinos	26
2.1.2. Preparación de cantidades estándar de virus	34

2.1.3.	Cepas virales para la evaluación de la especificidad	35
2.1.4.	Muestras clínicas	36
2.1.5.	Aislamientos de campo	38
2.1.6.	Muestras para determinaciones estadísticas	38
2.2.	Desarrollo de la PCR Multiplex	38
2.2.1.	Selección de cebadores	38
2.2.2.	Obtención de DNA molde	39
2.2.3.	Reactivos y soluciones estándar	41
2.2.4.	PCR no diferencial: protocolo base	42
2.2.5.	PCR Multiplex: protocolo base	43
2.2.6.	Análisis de los productos de PCR	43
2.2.7.	Secuenciación	44
2.3.	Detección de BHV-1 en semen	44
2.3.1.	Aislamiento viral	44
2.3.2.	PCR-M	45
2.4.	Análisis estadísticos	45
2.4.1.	Diseño experimental	45
2.4.2.	Análisis no paramétricos	45
2.4.3.	Análisis de agrupamiento	48
3.	Resultados	50
3.1.	Inoculaciones experimentales	50
3.1.1.	Inoculación experimental de BHV-1 en bovinos	50
3.1.2.	Inoculación experimental de BHV-5 en bovinos	52
3.2.	Desarrollo de la PCR Multiplex	55
3.2.1.	Diseño y análisis de cebadores	55
3.3.	PCR no diferencial	58
3.3.1.	Puesta a punto de la PCR no diferencial	58
3.3.2.	Análisis de las secuencias de los amplicones	58
3.4.	Puesta a punto de la PCR Multiplex	59
3.4.1.	Evaluación de los <i>primers</i>	59
3.4.2.	Optimización de la PCR-M	61
3.5.	Caracterización de la PCR Multiplex	62
3.5.1.	Especificidad	62
3.5.2.	Sensibilidad	63
3.6.	PCR-M a partir de muestras clínicas	65
3.6.1.	Hisopados nasales	65
3.6.2.	Muestras de órganos	68
3.7.	Evaluación de la técnica en aislamientos de campo	69
3.8.	PCR-M a partir de semen	70
3.9.	Análisis estadísticos	70
3.9.1.	Análisis descriptivos	71
3.9.2.	Análisis mediante remuestreo	71
3.9.3.	Análisis no paramétricos	75
3.9.4.	Análisis de agrupamiento	75

4. Discusión y conclusiones	77
Bibliografía	86
A. Anexo I: Datos epidemiológicos	98
A.1. Relevamiento serológico	98
A.1.1. Muestras provenientes de la provincia de Santa Fé	98
A.1.2. Muestras provenientes de la provincia de Buenos Aires	98
A.1.3. Muestras provenientes de la provincia de Córdoba	98
B. Anexo II: BLAST	103
B.1. Análisis de <i>primers diseñados</i>	103
B.1.1. Análisis del <i>primer</i> GC-1	103
B.1.2. Análisis del <i>primer</i> GC-2	103
B.1.3. Análisis del <i>primer</i> GD-33	104
B.1.4. Análisis del <i>primer</i> GD-1	105
B.1.5. Análisis del <i>primer</i> GD-2	105
B.1.6. Análisis del <i>primer</i> GD-3	106
B.1.7. GD-623	106
B.1.8. Análisis del <i>primer</i> GD-632	107
B.2. Análisis <i>primers</i> previamente publicados	108
B.2.1. Análisis del <i>primer</i> TK-1	108
B.2.2. Análisis del <i>primer</i> TK-2	108
B.2.3. Análisis del <i>primer</i> O-1	109
B.2.4. Análisis del <i>primer</i> O-2	110

Índice de cuadros

2.1. Diseño experimental: inoculación con BHV-1.	28
2.2. Diseño experimental: inoculación con BHV-5.	28
2.3. Estándares de BHV-1 y BHV-5.	35
2.4. Virus utilizados para análisis de especificidad.	36
2.5. <i>Primers</i> obtenidos de bibliografía.	39
2.6. Inoculación experimental con BHV-1: Análisis mediante PCR-M y AV.	46
2.7. Inoculación experimental con BHV-5: Análisis mediante PCR-M y AV.	46
3.1. Inoculación experimental con BHV-1: descarga nasal	51
3.2. Inoculación experimental con BHV-1: título viral en secreciones nasales	52
3.3. Inoculación experimental con BHV-5: título viral en secreciones nasales	54
3.4. <i>Primers</i> diseñados en base a secuencias de BHV-5	56
3.5. <i>Primers</i> para detectar BHV-5: sus combinaciones	57
3.6. Análisis de la sensibilidad de la PCR-M.	65
3.7. PCR-M en hisopados nasales (BHV-1).	66
3.8. PCR-M en hisopados nasales (BHV-5).	67
3.9. Inmunodetección y PCR-M en muestras de cerebro	68
3.10. Inmunodetección y PCR-M en aislamientos de campo	69
3.11. PCR-M en semen	70
3.12. Análisis estadísticos: concordancia (BHV-1 y BHV-5).	73
3.13. Análisis estadísticos: concordancia (BHV-1).	73
3.14. Análisis estadísticos: concordancia (BHV-5).	74
3.15. Análisis estadísticos. Remuestreos: porcentajes de concordancia por día	74
3.16. Índices <i>kappa</i> para BHV-1 por día.	75
3.17. Índices <i>kappa</i> para BHV-5 por día.	75
3.18. Índices <i>kappa</i> para BHV-1 y BHV-5 por día.	76
A.1. Estudios serológicos: provincia de Santa Fé	99
A.2. Estudios serológicos: provincia de Buenos Aires	99
A.3. Estudios serológicos: provincia de Córdoba	100

Índice de figuras

1.1. Organización genómica en <i>Herpesviridae</i>	6
1.2. Morfología de los herpesvirus	7
1.3. Replicación de los herpesvirus	10
1.4. Patogenia de la infección por herpesvirus 1.	12
2.1. Imagen de los boxes de aislamiento	29
2.2. Inoculación viral por vía intranasal	29
2.3. Aerosolización de la suspensión viral	30
3.1. Curva de excreción viral para BHV-1	52
3.2. Títulos de anticuerpos neutralizantes contra BHV-1	53
3.3. Curva de excreción viral correspondiente a BHV-5	55
3.4. Títulos de anticuerpos neutralizantes contra BHV-5	55
3.5. Electroforesis de las PCRs no diferenciales	59
3.6. Evaluación de pares de <i>primers</i> correspondientes a la gD de BHV-5	60
3.7. PCR Multiplex: utilización del protocolo base	61
3.8. Optimización de la PCR-M	61
3.9. Sensibilidad de la detección de BHV-1. Extracción fenólica	63
3.10. Sensibilidad de la detección de BHV-1. Tratamiento con <i>Chelex 100</i>	64
3.11. Sensibilidad de la detección de BHV-5. Extracción fenólica	64
3.12. Sensibilidad de la detección de BHV-5. Tratamiento con <i>Chelex 100</i>	65
3.13. Análisis estadísticos: detección de BHV-1 por AV y PCR-M	71
3.14. Análisis estadísticos: detección de BHV-5 por AV y PCR-M	72
3.15. Análisis estadísticos: componente temporal en el diagnóstico.	76
A.1. Estudios serológicos: muestreo	101
A.2. Estudios serológicos: localización de establecimientos muestreados	102

Abreviaturas

ABTS: 2,2'-Azino-bis 3 etilbenzo-tiazolina-6-ácido sulfónico.
ADCC: lisis mediada por el complemento.
Ag: antígeno.
AV: aislamiento viral.
BB: buffer de bloqueo.
BL: buffer de lavado.
BHV: Bovine Herpesvirus.
BHV-1: *Bovine Herpesvirus 1*.
BHV-1.1: *Bovine Herpesvirus 1* subtipo 1.
BHV-1.2: *Bovine Herpesvirus 1* subtipo 2.
BHV-1.3: *Bovine Herpesvirus 1* subtipo 3.
BHV-4: *Bovine Herpesvirus 4*.
BHV-5: *Bovine Herpesvirus 5*.
BP: buffer de pegado.
BuHV-1: *Bubaline Herpesvirus 1*.
BVDV: *Bovine Viral Diarrhea Virus*.
C: citosina.
°C: grados centígrados.
cm³: centímetros cúbicos.
CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
DICT: dosis infectivas en cultivos de tejidos.
DDT: dithiothreitol.
DMSO: dimetilsulfóxido.
DNA: ácido desoxirribonucleico.
dNTPs: deoxirribonucleótidos.
DO: densidad óptica.
DPD: días post-desafío.
DPE: días post-exposición.
dpi: días post-infección.
DPI: días post-inoculación.
DS: *downstream*.
DVR: diagnóstico virológico rápido.
ECP: efecto citopático.
EDTA: Acido Etilen Diamino Tetraacético.
EHV-2: *Equine Herpesvirus 2*.

EHV-4: *Equine Herpesvirus 4*.
ELISA: Enzime Linked Immunoassay.
FC: fijación del complemento.
G: guanina.
g: gramos.
gI: glicoproteína I.
gII: glicoproteína II.
gIII: glicoproteína III.
gIV: glicoproteína IV.
gB: glicoproteína B.
gC: glicoproteína C.
gC-: glicoproteína C-.
gD: glicoproteína D.
gE: glicoproteína E.
gH: glicoproteína H.
HAP: hemaglutinación pasiva.
HgCl₂: cloruro de mágnésio.
HIS: hibridación in situ.
HSV-1: *Herpes Simplex Virus 1*.
IBP: Balanopostitis Pustular Infecciosa.
IBR: Rinotraqueítis Infecciosa Bovina.
ICTV: *International Committee on Taxonomy on Viruses*.
IDGA: inmunodifusión en gel de agar.
IF: inmunofluorescencia.
IFD: inmunofluorescencia directa.
IFI: inmunofluorescencia indirecta.
IFN- α : interferón α .
IFN- γ : interferón γ .
IgA: inmunoglobulina A.
IgG₁: inmunoglobulina G subtipo 1.
IgG₂: inmunoglobulina G subtipo 2.
IgM: inmunoglobulina M.
IL-1: interleuquina 1.
IL-6: interleuquina 6.
INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
IP: inmunoperoxidasa.
IPV: Vulvovaginitis Pustular Infecciosa.
K: índice kappa.
Kpb: pares de kilobases.
L: componente largo.
LA: *Los Angeles*.
L_i: límite inferior.
LR: gen relacionado a la latencia.
L_s: límite superior.
M: molar.

MaE: material estándar.
ME: microscopía electrónica.
MEM-E: Medio Esencial Mínimo-Eagle.
m.i.: multiplicidad de infección.
ml: mililitro/s.
mM: milimolar.
NaOH: hidróxido de sodio.
NK: *natural killers*.
nm: nanómetros.
NSB 2: nivel de seguridad biológica 2.
NV: neutralización viral.
OIE: Oficina Internacional de Epizootias.
pág: página/s.
Pb: pares de bases.
PBS: buffer fosfato salino.
PCR: reacción en cadena de la Polimerasa.
PCR-M: PCR Multiplex.
PHV-1: *Porcine Herpesvirus 1*.
PI: post-inoculación.
R1: repetición interna 1.
R4: repetición interna 4.
RIs: repeticiones internas.
RNA: ácido desoxirribonucleico.
RT: transcripción reversa.
RTD: repeticiones terminales derechas.
RTI: repeticiones terminales izquierdas.
RT-PCR: Transcripción reversa seguida por amplificación mediante PCR.
RTs: repeticiones terminales.
S: componente corto.
sec: secreción.
SFB: suero fetal bovino.
SN: seroneutralización.
Tm: temperatura de *melting*.
TN: título neutralizante.
TNF- α : factor de necrosis tumoral α .
UFP: unidad formadora de placas.
ug: microgramo/s.
UI: unidades internacionales.
ul: microlitro/s.
Ul: segmento largo.
uM: micromolar.
Us: segmento corto.
US: *upstream*.
V: voltios.
vs: *versus*.

WB: *western blot*.

Capítulo 1

Generalidades

1.1. Introducción

Bovine herpesvirus 1 (BHV-1) y *Bovine herpesvirus 5* (BHV-5) pertenecen a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus* [1].

BHV-5 es muy similar a BHV-1 con respecto a la morfología de los viriones, a las características del efecto citopático en cultivos celulares, y a las propiedades antigénicas demostradas mediante neutralización [2]. Por esta razón, los primeros aislamientos de BHV-5 fueron clasificados como BHV-1. Más tarde, las diferencias encontradas en los mapas de restricción genómicos condujeron a su ubicación en un subtipo dentro de BHV-1: el subtipo 3 (BHV-1.3). En el subtipo 1 (BHV-1.1) se clasificaron los aislamientos asociados principalmente a los cuadros respiratorios, y en el subtipo 2 (BHV-1.2) los correspondientes a cuadros genitales. BHV-1.3 se observó asociado a brotes de encefalitis [3, 4, 5, 6]. Posteriormente, en base a los resultados obtenidos mediante electroforesis de las proteínas virales en geles de polyacrilamida [6, 7, 8], análisis con enzimas de restricción [6, 8, 9, 10, 11, 12], hibridización con sondas de DNA [9, 11, 12], neutralización [6, 7, 13], y reactividad con paneles de anticuerpos monoclonales [8], se demostró que los aislamientos de cuadros encefalíticos poseían características particulares, que los distinguían claramente de los virus aislados de casos respiratorios y genitales, lo cual generó la necesidad de definir una nueva especie donde ubicarlos. En 1992 estos aislamientos particulares recibieron la denominación

actual de BHV-5 [14].

La similitud genómica¹ entre BHV-1 y BHV-5 es aproximadamente del 85 %, mientras que entre el tipo respiratorio (BHV-1.1) y genital (BHV-1.2) la similitud es superior al 95 % [9, 11].

BHV-1.2 puede subdividirse en los subtipos BHV-1.2a y 2b en base al análisis con enzimas de restricción y al perfil proteico [8, 11]. BHV-5 también puede ser clasificado en dos grupos a y b, debido a la existencia de patrones electroforéticos diferentes de las glicoproteínas del virus, lo cual fue observado por primera vez para las cepas N569 y A663 por Metzler *et al* [8].

BHV-1 presenta una distribución mundial; produce un amplio rango de manifestaciones clínicas tales como conjuntivitis, rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV) y balanopostitis (IBP). También se asocia a enteritis, aborto, y a enfermedad generalizada y muerte en neonatos.

BHV-5 fue aislado de brotes de encefalitis en Australia [15, 2, 16], Estados Unidos [17, 18], Argentina [19], y otros países de América y Europa [20, 21, 22, 23]. Como se mencionó anteriormente, en los casos clínicos producidos por BHV-5 se observaron infecciones generalizadas, con cuadros de meningoencefalitis generalmente mortales. Los afectados son animales jóvenes, de entre 5 y 24 meses de edad.

En cuanto al aspecto productivo, si bien no se han establecido claramente cuáles son las pérdidas reales provocadas por las infecciones con estos herpesvirus bovinos, se sabe que las mismas en el caso de BHV-1, se asocian con una disminución de la producción en la fase aguda de la enfermedad, y con la aparición de abortos cuando la infección ocurre en la segunda mitad de la gestación [24, 25, 26].

Ambos virus tienen la habilidad de establecer infecciones latentes, lo que permite su dispersión mediante animales portadores, pudiendo permanecer en los rodeos y establecer la enfermedad en forma endémica [27, 24, 25, 26, 28].

Los aspectos epidemiológicos de la infección con BHV-5 no han sido estudiados en profundidad.

En varios países de Europa se han instrumentado medidas de control dirigidas a disminuir el

¹Número de posiciones iguales sobre el largo total de las secuencias comparadas.

impacto de la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), mediante planes de erradicación obligatorios en algunos casos y voluntarios en otros. Los países que se encuentran libres de esta enfermedad son Austria, Dinamarca, Finlandia, Suiza, Noruega, Suecia y la región de Belzano en Italia. Holanda, Francia, Bélgica y Gran Bretaña han comenzado a establecer medidas tendientes a lograr la erradicación de este agente. Por otro lado, tanto en América como en Europa se están realizando estrictos controles en la comercialización del ganado, semen y embriones [29, 30, 31].

Con respecto al diagnóstico, los métodos más utilizados para la detección de los herpesvirus bovinos son el aislamiento viral (AV) y las técnicas de inmunohistoquímica (inmunoperoxidasa, IP, e inmunofluorescencia, IF). Para la detección de animales seropositivos se utilizan la seroneutralización (SN), la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la hemaglutinación pasiva (HAP), y la técnica de ELISA [32, 33, 34, 35, 36]. Se ha comprobado que existe inmunidad cruzada entre ambas especies virales [13, 37]. Por esta razón es posible que los métodos inmunológicos presenten la dificultad de producir clasificaciones erróneas, además de ser muy laboriosos cuando deben analizarse grandes cantidades de muestras. Si bien la utilización de enzimas de restricción e hibridación de ácidos nucleicos ha sido muy valiosa para lograr una clasificación genética, su utilización en un laboratorio de diagnóstico resulta poco adecuada debido al tiempo que insume.

En los últimos años se han publicado algunos trabajos que describen métodos de PCR capaces de detectar BHV [38, 39, 40, 41], pero por el momento sólo algunos de ellos logran diferenciar entre BHV-1 y BHV-5. Se ha desarrollado una PCR anidada diferencial que requiere tres rondas de amplificación para obtener muestras positivas [42]. En otro trabajo se describe una PCR diferencial donde parte del gen que posee la secuencia a amplificar es clonado previamente sirviendo el plásmido de clonado como molde para la PCR [41].

En esta tesis se diseñó e implementó una PCR Multiplex que permite amplificar porciones del genoma diferenciales entre BHV-1 y BHV-5. Esto se logró utilizando combinaciones de cebadores específicos para ambos virus. Este método permite procesar rápidamente grandes cantidades de muestras.

1.2. Taxonomía de la familia *Herpesviridae*

Los miembros de la familia *Herpesviridae* fueron inicialmente clasificados por el ICTV (*International Committee on Taxonomy on Viruses*) [1], en base a sus propiedades biológicas, en tres subfamilias: *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*. Esta clasificación se estableció antes de que se conocieran las secuencias de DNA de los miembros de esta familia. Posteriormente un pequeño grupo de herpesvirus fueron incluidos en géneros, basándose en la similitud de sus secuencias, la organización de sus genomas y las características de algunas de sus proteínas [1, 43].

Los miembros de la subfamilia *Alfaherpesvirinae* presentan un amplio rango de hospedadores naturales y un ciclo productivo relativamente corto. Tienen capacidad de establecer infecciones latentes en ganglios sensoriales y producen un rápido efecto citopatogénico lítico en cultivos celulares. Esta subfamilia comprende los géneros *Simplexvirus* (ej. *Human herpesvirus 1*, Herpes simplex virus 1), *Varicellovirus* (ej. *Bovine herpesvirus 1*, *Bovine herpesvirus 5*), *Mardivirus* (*Marek's disease-like viruses*) e *Iltovirus* (*Infectious laryngotracheitis-like viruses* [43, 1].

Los virus de la subfamilia *Betaherpesvirinae* poseen un restringido rango de huéspedes, ciclo reproductivo prolongado, lenta diseminación en cultivos celulares y baja citopatogenicidad. Pueden infectar latentemente células linforreticulares, glándulas salivares, riñón y otros tejidos. Comprenden los géneros *Cytomegalovirus* (ej. *Human herpesvirus 5*, Human cytomegalovirus), *Muromegalovirus* (ej. *Murid cytomegalovirus 1*) y *Roseolovirus* (ej. *Human herpesvirus 6*) [43].

En la subfamilia *Gammaherpesvirinae* el rango de huéspedes se restringe a la familia u orden al que pertenece el hospedador natural. Estos virus replican in vitro en células linfoblásticas y fibroblásticas. Infectan linfocitos, tendiendo a ser específicos para células T o B (aunque pueden ocurrir excepciones), a los que pueden transformar produciendo tumores. Desarrollan latencia en tejido linfático. Comprenden los géneros: *Linfocriptovirus* (ej. *Human herpesvirus 4*, Epstein-Barr virus), *Rhabdinovirus* (ej. *Saimiriine herpesvirus 2* e *Ictalurivirus* (*Ictalurid herpes-like viruses*) [43, 1].

Los disponibilidad de secuencias de DNA de virus de la familia *Herpesviridae*, ha permitido

realizar estudios taxonómicos posteriores. Estos estudios han resultado en una clasificación congruente con la estructura taxonómica propuesta a partir de las características biológicas antes mencionadas [43].

Entre los miembros de la familia *Herpesviridae* se han descrito genomas con características diferentes que han permitido que los mismos puedan ser divididos en 6 grupos, designados desde A a F. En 5 de estos grupos, existen regiones repetitivas de más de 100 pares de bases (pb) que presentan diferente ubicación dentro del genoma. Estas diferencias genómicas se encuentran representadas en la Figura 1.1.

En el grupo A, ambos extremos del genoma poseen las mismas secuencias repetitivas que se designan como repeticiones terminales derechas e izquierdas (RTD y RTI). *Human herpesvirus 6* y *Equide herpesvirus 2* representan ejemplos de este grupo.

En el grupo B, la secuencia terminal de los dos extremos es una misma región repetida numerosas veces, pudiendo el número de repeticiones variar en alguno de ellos, al mismo pertenecen *Saimiriine herpesvirus 2* y *Ovine herpesvirus 2* entre otros.

Los miembros del grupo C, como *Epstein-Barr virus*, presentan repeticiones terminales (en menor cantidad que los grupos anteriores) y secuencias repetidas ubicadas en tramos específicos del genoma (R1 a R4).

En el grupo D existen repeticiones internas y terminales repetidas (RIs y RTs) que flanquean una región del genoma denominada segmento corto (Us). El segmento corto puede invertirse con respecto a otra región denominada segmento largo (Ul), de manera que el DNA extraído de viriones o de células infectadas representa dos poblaciones equimolares que sólo difieren en la orientación del componente Us en relación a la orientación fija del componente Ul [14, 27, 43, 44]. A este grupo pertenecen *Bovine herpesvirus 1* y *Bovine herpesvirus 5*.

En el grupo E, las secuencias de ambos extremos están repetidas en una orientación invertida y yuxtapuesta, dividiendo el genoma en los componentes Ul y Us cada uno de los cuales consiste en una única secuencia flanqueada por repeticiones invertidas. Estas regiones pueden invertirse una con respecto a la otra y entonces el DNA extraído de los viriones o de células infectadas consiste en 4 poblaciones equimolares difiriendo en la orientación relativa de los dos componentes.

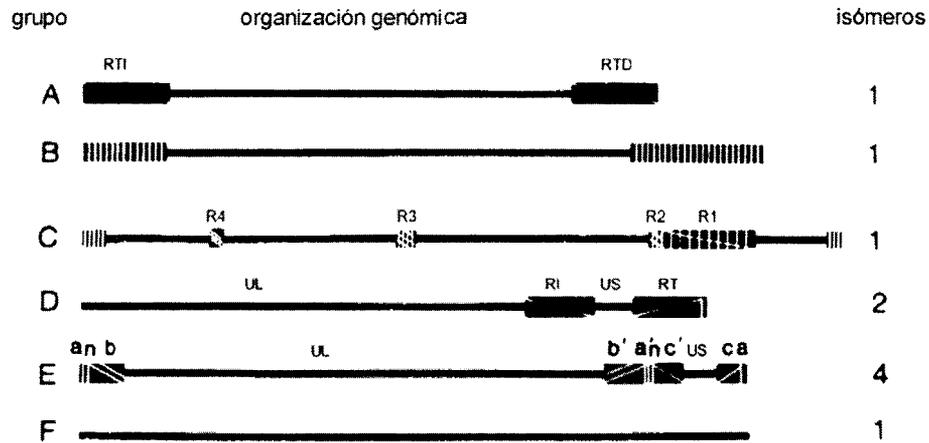


Figura 1.1: Diagrama esquemático de los seis grupos de genomas de los virus que comprenden la familia Herpesviridae. La línea horizontal representa regiones únicas o casi únicas. Los dominios repetitivos se muestran como rectángulos. RTD: repeticiones terminales derechas, RTI: repeticiones terminales izquierdas, R1 a R4: repeticiones internas 1 a 4, RI: repeticiones internas, RT: repeticiones terminales, n: número de copias de una secuencia a, b: secuencia b, c: secuencia c, anb: secuencias terminales anb, ca: secuencias terminales ca, UL: segmento largo, Us: segmento corto [43].

En este grupo se encuentra *Bovine herpesvirus 2*.

En el caso de los genomas pertenecientes al grupo F, las secuencias de los extremos no son idénticas y no se repiten. Un representante del grupo es *Murid cytomegalovirus*.

1.3. Herpes Virus Bovinos 1 y 5.

1.3.1. Morfología y genoma viral

La partícula viral de los herpesvirus presenta una doble cadena lineal de DNA y una cápside icosaédrica compuesta por 162 capsómeros (100 – 110 nm). En la Figura 1.2 se observa la representación esquemática del virión.

Entre la cápside y la envoltura se encuentra el tegumento, material de apariencia fibrosa en las tinciones negativas, que si bien puede distribuirse en forma asimétrica, es considerado como una estructura ordenada. El grosor del tegumento puede variar dependiendo de la ubicación del virión dentro de la célula infectada.

La envoltura representa la cubierta externa del virus. Es una membrana trilaminar de consis-

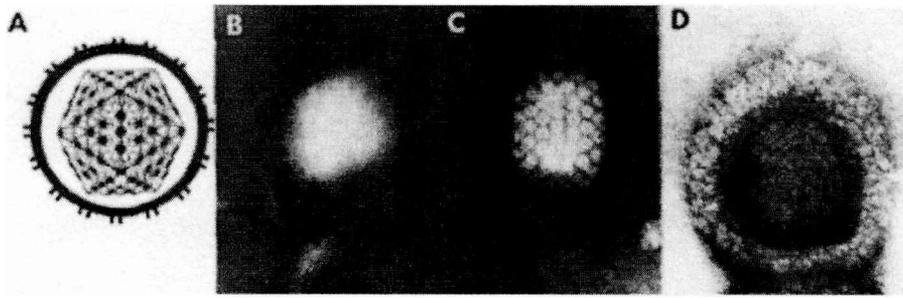


Figura 1.2: Morfología de los herpesvirus. A: representación esquemática de un corte transversal de un virión de herpesvirus. En la envoltura aparecen proyecciones desde la superficie; la cápside presenta simetría icosaédrica. B: tinción negativa de un virión intacto de HSV-1, la envoltura intacta no permite la tinción negativa, el diámetro del virión es de 120 nm. C: cápside de HSV-1 sometida a tinción negativa, se observa la simetría icosaédrica de la cápside; la imagen es coincidente al gráfico en A. D: cápside de HSV-1 conteniendo DNA impregnado con acetato de uranilo [43].

tencia lipídica que posee numerosas protrusiones glicoproteicas en su superficie. Los viriones de los herpesvirus varían en su tamaño desde 120 hasta 300 nm. Esta variación depende aparentemente del grosor del tegumento [14, 43, 45].

El genoma posee una longitud aproximada de 135 kpb a 140 kpb y presenta un contenido de $G + C$ del 72%. El DNA genómico está compuesto por dos regiones denominadas componente largo (L) y componente corto (S) [14, 27, 43, 44]. Su organización genómica corresponde a la descrita para el grupo D, con un segmento largo (UL) de aproximadamente 104 kpb y un componente corto (Us) de aproximadamente 9,5 a 11 kpb. El genoma posee repeticiones internas y terminales invertidas (RIs y RTs) [14, 27, 43, 44].

El genoma de los herpesvirus codifica aproximadamente unas 70 proteínas. Sólo 33 de ellas son estructurales (13 asociadas con la envoltura viral, 14 con la nucleocápside, y 6 que aún no han sido caracterizadas); y son 15 las no estructurales. Se considera que del total de estas proteínas, existen 4 glicoproteínas o complejos glicoproteicos principales designados gI (gB), gII (gE), gIII (gC) y gIV (gD) [27].

Las glicoproteínas gC, gB, y gD se encuentran en la envoltura viral y en la membrana plasmática de las células infectadas. Son responsables de la adsorción del virión a la membrana celular mediante su unión a receptores celulares [27]. Tanto la gC como la gB se unen a residuos heparan sulfato de los proteoglicanos celulares [43, 46, 47, 27] siendo gC considerada la glicopro-

teína más importante en la adsorción. Sin embargo, no se considera esencial para la replicación. Se ha demostrado que virus mutantes gC– pueden iniciar la infección y replicar tanto *in vivo* como *in vitro* [48, 27]. Se cree que gB y gD son ligandos de unión secundarios. Además intervienen en la penetración y en el proceso de fusión celular [43, 46]. Las tres glicoproteínas inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, siendo gD la que genera una respuesta mayor [27]. La glicoproteína gH se encuentra en la envoltura viral. Está involucrada en el ingreso del virus al interior celular y en la diseminación celular [27].

1.3.2. Propiedades físicoquímicas

La densidad de los herpes bovinos en gradiente de cloruro de cesio es de 1,249 a 1,254 g/cm³, y en gradiente de tartrato de potasio es de 1,22 g/cm³. Estos virus son muy estables en un amplio rango de temperatura. El título viral permanece constante después de 9 meses de almacenado a –60° C. A 4° C hay una pérdida de 1 logaritmo en el título después de 30 – 40 días de almacenamiento. Luego de 50 días a 24° C, de 10 días a 37° C y de 21 días a 56° C, se inactivan completamente. Las suspensiones virales resultan estables entre pH 6 y 9, perdiendo actividad rápidamente a pH inferior a 6. Son extremadamente susceptibles a solventes lipídicos tales como éter etílico, acetona, y cloroformo, a desinfectantes como NaOH (0,5 %), HgCl₂ (0,01 %), derivados fenólicos (1 %), y bases de amonios cuaternarios a la misma concentración. La formalina al 40 % inactiva el virus pero en menor proporción [26].

1.3.3. Ciclo viral

El ciclo del virus comienza con la adsorción de la partícula viral a la superficie celular mediante la unión de glicoproteínas virales a receptores celulares. El ingreso al interior celular ocurre como resultado de un mecanismo complejo, que puede subdividirse en cuatro fases: pegado o adsorción, fusión, perforación y penetración, y por último transporte intracelular. Este proceso incluye un tipo de fusión particular de la membrana externa de la envoltura viral con la capa interna de la membrana plasmática de la célula hospedadora y viceversa, lo cual resulta en la formación de un entrecruzamiento en el sitio de fusión. De esta manera se produce la inserción

parcial de la envoltura viral dentro de la membrana plasmática. La importancia de este tipo de fusión aún no ha sido esclarecida; ciertamente no habilita al virus a ingresar al citoplasma, ya que éste logra ingresar al interior celular a través de una invaginación que se desarrolla cerca del área de fusión y que se abre hacia el citoplasma [49].

Posteriormente la cápside y el tegumento son transportados hacia los poros de la membrana nuclear, mecanismo en el que se encuentra involucrado el citoesqueleto celular [43, 49, 50]. A nivel de los poros nucleares, ocurre la decapsidación, y el DNA viral es liberado en el interior del núcleo, donde inmediatamente se circulariza [45].

En la transcripción de los genes virales están involucradas varias enzimas, entre ellas una RNA-polimerasa II de origen celular, y varias proteínas del tegumento (como Bt1f y VP8), que actúan inhibiendo la síntesis de macromoléculas celulares [27].

La transcripción y la replicación tienen lugar en el núcleo, mientras que la síntesis de proteínas ocurre en el citoplasma. La expresión de los genes virales representa un proceso en cascada que ocurre en tres fases. Los genes *alfa* son los primeros en transcribirse, generando seis polipéptidos, cinco de los cuales actúan regulando la expresión génica en el núcleo y activan la expresión de los genes beta. Las proteínas *beta* están implicadas en la replicación del DNA viral. La síntesis de DNA viral estimula la expresión de los genes *gamma*, cuyas proteínas están relacionadas con el ensamblado de la cápside en el núcleo y en la formación del virión [43, 45].

La síntesis del genoma viral ocurre por medio de un mecanismo de círculo rodante, por medio del cual se producen concatémeros, que luego experimentan una escisión específica en unidades genómicas independientes que se ensamblan con las proteínas de la cápside y se adsorben en la región de la membrana nuclear donde se encuentran ubicadas en alta concentración las glicoproteínas virales. Luego, en un proceso de maduración, las cápsides adquieren la envoltura al brotar a través de la membrana nuclear. La liberación se produce por fagocitosis reversa o por disrupción de la membrana plasmática [43, 45]. En la Figura 1.3 se representan las principales etapas del ciclo viral.

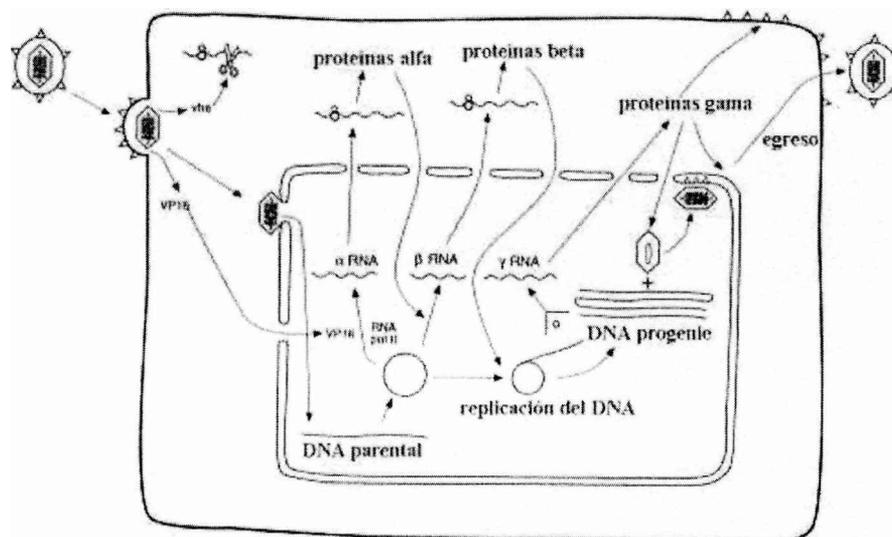


Figura 1.3: *Diagrama de replicación de herpesvirus [43].*

1.4. Enfermedades producidas por BHV-1 y BHV-5

1.4.1. Patogenia y síntomas clínicos

El proceso de infección comprende tres estadios diferentes: enfermedad aguda, latencia y reactivación.

En la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) la puerta de entrada son las vías respiratorias o la mucosa orofaríngea. Una vez que el virus ingresa en el organismo, se replica activamente en el epitelio de las cavidades nasal y bucal, y de las vías respiratorias superiores, provocando la destrucción de los mismos y favoreciendo el establecimiento de infecciones bacterianas secundarias. Los tejidos oculares también pueden verse afectados.

Por medio de una diseminación sistémica a través de la sangre, del sistema nervioso o de puentes intercelulares, el virus alcanza distintos órganos blanco. También puede ser transportado por los leucocitos periféricos hacia la placenta e invadir el feto produciendo un cuadro sobrealimentado.

La infección fetal puede ocurrir a partir del quinto mes de gestación, pudiendo causar momificación, aborto, natimortos o terneros débiles. Los fetos abortados presentan autólisis, coloración pardusca, tejidos friables y fluidos en las cavidades corporales [32, 25, 26].

El período agudo de la enfermedad comienza entre 2 a 6 días después de la infección, pudiendo durar hasta dos semanas. En este período los animales presentan anorexia, fiebre (hasta 42°C), hiperemia de la mucosa nasal con acúmulos grisáceos de necrosis, secreción nasal y ocular, sialorrea e hiperexcitabilidad. La conjuntivitis es un signo frecuente y puede afectar uno o ambos ojos, observándose secreción ocular profusa, principalmente serosa. Puede producirse muerte súbita 24 horas después de la aparición de los primeros signos, como consecuencia de una bronquiolitis obstructiva extensa. En este período es factible hallar altos títulos de virus en los exudados nasales y conjuntivales [32, 25, 26].

Al finalizar la fase aguda, el virus puede ingresar en las células nerviosas locales y movilizarse usando el transporte axonal retrógrado hasta el ganglio trigémino, donde establece la infección latente.

Durante la infección latente no se detecta excreción viral ni sintomatología en los animales portadores. El virus se reactiva a intervalos regulares [32, 24, 25, 26, 51]. Aunque en estos períodos los títulos de eliminación se encuentran en el orden de 10^6 $DICT_{50\%}/ml^2$, generalmente no se presentan síntomas clínicos [24, 25, 26]. Las particularidades del ciclo se esquematizan en la Figura 1.4.

La Vulvovaginitis Infecciosa Bovina en las hembras o Balanopostitis Infecciosa Bovina de los machos (IPV/IPB) es una típica enfermedad venérea en la cual BHV-1 alcanza directamente las células blanco, que son las células de las mucosas de la vulva, vagina y prepucio. La fase aguda de la enfermedad se desarrolla 2 o 3 días luego del servicio, teniendo una duración de 2 a 4 días. En la IPB, la mucosa de la vulva aparece edematosa e hiperémica, con pequeñas pústulas diseminadas sobre la superficie de la misma, acompañada a veces con una descarga vaginal mucopurulenta debido a infecciones bacterianas secundarias. En esta fase aguda, el animal puede presentar fiebre, anorexia y depresión. Las lesiones pueden persistir usualmente hasta 10 – 14 días. En los machos la IPB aparece con inflamación del pene y el prepucio. Los signos de infección pueden variar de grado desde mediano a severo, estando asociados a una reducción en la calidad del semen. En estos casos, el sitio de latencia es el ganglio sacro [32, 25, 26].

² $DICT_{50\%}$ es la cantidad de inóculo que produce efecto citopático en el 50 % de las monocapas infectadas.

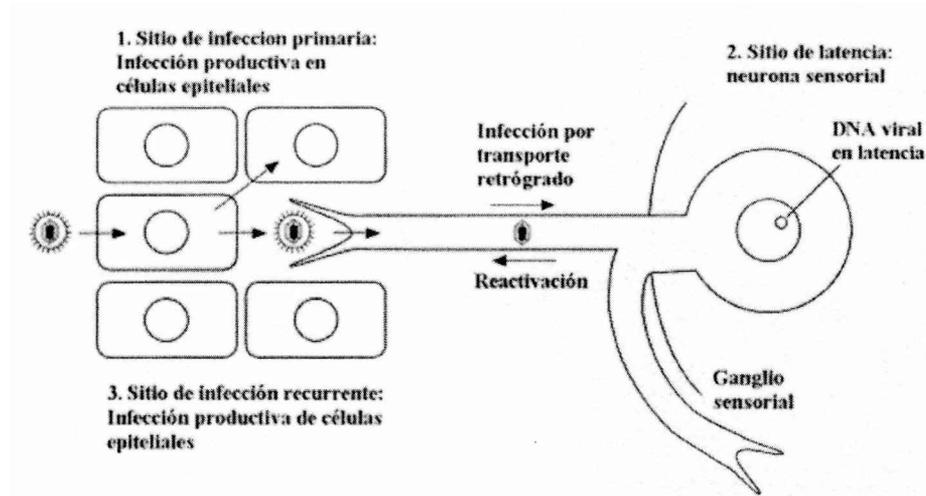


Figura 1.4: **Patogenia de la infección por herpesvirus 1** [43].

En los cuadros de meningoencefalitis, el virus llega al cerebro a través de las ramas maxilar y mandibular del nervio trigémino, o bien puede hacerlo a través de los bulbos olfatorios y/o de las meninges a partir del hueso etmoides. Los signos relacionados con la enfermedad nerviosa son depresión, anorexia, ptialismo, amaurosis, bruxismo, incoordinación, tremor muscular, ceguera y muerte [19, 7, 25, 26].

1.4.2. Latencia

La importancia de este fenómeno radica en que un animal latentemente infectado actúa como portador del virus, colaborando en el establecimiento de la enfermedad endémica [24, 25].

La latencia involucra el mantenimiento del DNA viral en forma extracromosomal en las neuronas de los ganglios sensoriales. El virus puede permanecer en estado latente durante toda la vida del hospedador, o bien puede reactivarse periódicamente. La reactivación puede ocurrir o ser inducida por diferentes estímulos como parto, transporte, tratamiento inmunosupresor con corticoides, irradiación con luz ultravioleta, superinfección con otros virus, etc [32, 27, 24, 25, 26, 51, 52, 53].

En contraste con los 70 u 80 genes virales expresados durante la infección lítica, la expresión génica disminuye drásticamente durante la latencia. Sólo una pequeña región del genoma, co-

respondiente al *gen relacionado a la latencia (LR)*, es activamente transcripta. Los transcriptos originados del gen LR se acumulan en el núcleo de las células de los ganglios sensoriales durante la infección latente, y también en las etapas terminales de la infección lítica. Se ha propuesto que los mismos podrían controlar la expresión de genes inmediato-tempranos [27, 51, 52, 53].

Aún no se conocen los mecanismos exactos mediante los cuales el virus se mantiene en estado latente, pero se sugiere que factores celulares de los tejidos, mecanismos de defensa del sistema inmune, así como factores inherentes al virus, pueden estar involucrados [52, 53, 54].

1.4.3. Epizootiología

La liberación de altos títulos de virus durante la enfermedad aguda y el posterior establecimiento de infecciones latentes constituyen los mecanismos de persistencia de BHV-1 en los rodeos.

En la fase aguda de la enfermedad, se produce la mayor eliminación de virus. Durante las dos primeras semanas de iniciada la infección, aparecen los títulos más altos (ver Figuras 3.1 y 3.3 en las páginas 52 y 55, respectivamente). Entre el cuarto y sexto día post-infección (dpi.), el título viral en las secreciones nasales puede ser de $10^{10} DITC_{50\%}/ml$. En las infecciones genitales con BHV-1 asociado a IPV se pueden observar títulos aún más elevados ($10^{11} DITC_{50\%}/ml$). El semen puede contener hasta $10^8 DITC_{50\%}/ml$ [24].

Los animales que excretan virus de la mucosa nasal lo transmiten a los otros animales mediante contacto directo de sus mucosas y por aerosoles. Aquellos que excretan virus desde los órganos genitales contagian, menos eficientemente, por vía venérea (aunque pueden transmitir el virus también mediante aerosoles). El virus puede transmitirse por semen durante el servicio natural o por inseminación artificial, y las vacas infectadas por inseminación artificial pueden transmitir el virus a otras vacas del mismo rodeo [32, 24, 25, 26].

Se ha reportado que la dosis necesaria para producir infección respiratoria podría ser de $10^2 DITC_{50\%}/ml$ o aún menor. En el caso de la transmisión por inseminación artificial, se ha observado que pequeñas cantidades de virus (200 $DITC_{50\%}/ml$ por pajuela) pueden provocar seroconversión en los animales afectados [55].

Cuando casi todos los animales de la población se han infectado y han comenzado a desarrollar inmunidad, el ciclo de primoinfección finaliza [24].

La posibilidad de transmisión interespecie está pobremente documentada. Si bien otros rumiantes pueden infectarse con los herpesvirus bovinos, esto no sería relevante en la diseminación de estos virus entre los animales domésticos. Aparte de los rumiantes, no se conocen otros reservorios [32, 24].

Las enfermedades causadas BHV-1 no ocasionan altas tasas de morbilidad y mortalidad. En los rebaños lecheros las mismas son del 8% y 3% respectivamente. En rodeos productores de carne, la morbilidad es del 20 – 30%, pudiendo llegar al 100%. La tasa de mortalidad en el ganado de carne se debe a la traqueítis bacteriana secundaria y a la bronconeumonía, pudiendo alcanzar una cifra del 10%, aunque por lo general no supera el 1%. El motivo por el cual la mortalidad y morbilidad son más altas en el ganado de carne que en los rebaños lecheros es que, en los primeros, la introducción de animales susceptibles es más frecuente [25].

1.4.4. Respuesta inmune

La exposición del sistema inmune a BHV-1 induce una fuerte respuesta inespecífica y específica (respuesta T y B). La respuesta inespecífica, es mediada por la acción de células polimorfonucleares, macrófagos, células *natural killers* (NK), interferones, el complemento, y de otros factores que pueden limitar la adsorción de la partícula viral a la superficie del epitelio respiratorio. Algunos de estos elementos, como el complemento, son constitutivos del organismo hospedador; mientras que otros, como el interferón, son inducidos por la presencia del virus. La importancia de cada uno de estos elementos varía según se trate de una infección viral primaria o secundaria, donde ya están presentes los anticuerpos y las células de memoria [27, 56].

Los patrones de excreción viral en las secreciones nasales y genitales sugieren que, en las mucosas, la respuesta inespecífica cumple un rol fundamental en la prevención de la infección viral primaria. Las respuestas humoral e inespecífica protegen al bovino frente a infecciones secundarias y frente a la reactivación viral, ya que los anticuerpos pueden actuar neutralizando las partículas virales [56].

En la infección primaria, al no haber anticuerpos dirigidos contra el virus, no hay interferencias en el contacto de las glicoproteínas virales (gC, gB y gD) y los receptores de las células epiteliales. Dentro de las cinco horas posteriores a la infección, cuando comienzan a aparecer los antígenos virales en las células infectadas, se evidencia la respuesta inmune inespecífica a través de la presencia de Interferón alfa (IFN- α) en las secreciones. Los niveles más altos del mismo se observan entre las 36 y 72 horas post-infección, y persiste hasta los 8 dpi. El IFN- α modula el reclutamiento de leucocitos, macrófagos y células NK en el sitio de infección. Estas células liberan una ola de citoquinas tempranas que actúan como instrumentos de iniciación de la inflamación, de reclutamiento de más células inflamatorias y en la organización de la respuesta específica contra el virus [27, 56, 57]. Entre ellas, las interleuquinas 1 y 6 (IL-1, IL-6) y el Factor de necrosis tumoral (TNF- α) actúan como señales activadoras sobre los linfocitos T, y estimuladoras de la llegada masiva de macrófagos [56, 58]. Asimismo, una vez expuestos al IFN- α , los macrófagos desarrollan una resistencia a la infección por BHV-1, y aumentan su actividad citolítica [26, 56].

La acción de las células NK depende de la expresión de los antígenos virales en la superficie de las células infectadas. Las glicoproteínas gB y gD parecen ser los blancos principales de las células NK [56].

Los macrófagos y las células NK pueden eliminar a las células infectadas mediante mecanismos no restringidos al CMH (*Complejo Mayor de Histocompatibilidad*). Esta es la respuesta citotóxica más importante contra la infección por BHV. La misma requiere de la presencia de los linfocitos T, ya que estas células producen interferón gamma (IFN- γ), que activa la respuesta citotóxica no restringida por el CMH [56].

La actividad citotóxica aparece a la semana de iniciada la infección, correspondiendo con la disminución de los síntomas. Este es el momento de mayor actividad de la inmunidad celular, y ocurre antes de que la respuesta por anticuerpos sea detectable. Estos mecanismos de citotoxicidad son importantes para evitar la diseminación viral ya que, una vez iniciada la infección, la diseminación hacia otras células ocurre por mecanismos intracelulares [26, 56].

Si bien la inmunidad celular cumple un rol fundamental en los procesos de recuperación de la infección primaria, ésta debe actuar en concordancia con las respuestas inmune inespecífica y

humoral para asegurar una rápida eliminación del virus [56].

Los anticuerpos actúan en la prevención de la infección secundaria, y en la neutralización viral durante la diseminación extracelular. Además, se ha demostrado mediante estudios *in vitro* que los anticuerpos son importantes para la inhibición de la multiplicación viral y la diseminación del virus entre células, ya que actúan tanto en la citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC) como en la lisis mediada por el complemento [27, 26].

La respuesta humoral específica puede ser detectada en distintos compartimentos del sistema inmune, en diferentes tiempos post-infección. La inmunoglobulina M (IgM) es el primer isotipo que se detecta luego de la infección, primeramente en suero, y luego en secreciones nasales y oculares. La respuesta Ig A específica es detectable en suero y secreciones entre los 12 y 21 dpi. Se detectan anticuerpos IgG₁ a los 13 dpi., primero en suero y luego en secreciones. Finalmente, a los 25 dpi. son detectables los anticuerpos IgG₂ sólo en suero.

La respuesta de anticuerpos neutralizantes es detectable alrededor de los 10 dpi. (Figuras 3.2 y 3.4) y requiere de una reestimulación para su persistencia. Estos anticuerpos están dirigidos contra las glicoproteínas virales, correspondiendo los epitopes neutralizantes a las glicoproteínas gH, gC y gD [59, 60, 61, 62].

1.5. Importancia económica

Cuando BHV es introducido en una región, puede causar enfermedad clínica severa, abortos y disminución brusca de la producción de leche. Esto resulta en altas pérdidas económicas. Cuando la infección es endémica, no se observan tasas elevadas de mortalidad y morbilidad [63].

Los factores que más se tienen en cuenta en la estimación de pérdidas económicas son: el valor de mercado de los animales muertos o que deben enviarse a faena de emergencia, los costos de alimentación de animales que estando en el período agudo de la enfermedad no aumentan de peso, costos de tratamiento, y la disminución en la producción de leche [63].

En la literatura existen muy pocas estimaciones acerca de las pérdidas económicas producidas por los herpesvirus bovinos. En Holanda se ha determinado que con una prevalencia superior

al 60 %, las pérdidas económicas superaron los 27 millones de dólares anuales [31]. Otras estimaciones indicaron que en animales de cebo con enfermedad clínica, las pérdidas podrían llegar a 36 libras por animal y en rodeos lecheros a 6 libras, [64]. En la etapa de seroconversión puede producirse una disminución en la producción láctea de hasta 9,5 litros por animal por día [65].

1.6. Epidemiología

1.6.1. Situación epidemiológica de BHV-1 a nivel mundial

Si bien BHV-1 ha sido erradicado en varios países europeos, la distribución de la infección por BHV-1 es mundial, y la prevalencia de reactores serológicos indica que prácticamente todos los bovinos mayores de 3 años estuvieron en contacto con el virus. Se han registrado brotes de la forma respiratoria en Estados Unidos y Canadá. La enfermedad genital (IPV) es más común en Europa [26].

Suecia, Suiza, Finlandia, Austria, Dinamarca, Noruega y la región de Belzano en Italia se encuentran libres de BHV-1, ya que han implementado planes de erradicación. En Holanda, Francia, Bélgica y el Reino Unido existen actualmente medidas de control en el uso de vacunas convencionales (no marcadas) y planes de erradicación regionales voluntarios. En estos países la prevalencia de la enfermedad varía entre el 20 y el 80 %. Los países con mayor prevalencia histórica han sido Holanda y Bélgica (60 – 90 %). En general la prevalencia en el resto de Europa varía entre 20 y 50 % (Francia: 20 %, Alemania: 30 – 50 %, Inglaterra: 50 %, Italia: 34 – 99 %) [31, 66].

La forma respiratoria y los abortos causados por BHV-1 son altamente prevalentes en América del Norte. Los cuadros respiratorios emergieron como un problema de alto impacto económico en rodeos lecheros y en sistemas de engorde a corral (*feed lots*) en Estados Unidos en 1954, aunque ya se habían reportado casos de la enfermedad desde 1950. En 1956 se aisló el agente causal [67, 26] y en 1961 se sugirió que el virus de IBR pertenecería al grupo de los herpesvirus [26]. En 1958 se aisló BHV-1 de un caso de IPV, reconociéndose su similitud con casos de enfermedad genital descritos en Europa desde mitad del siglo XIX, particularmente en Alemania [26].

En América del sur se tienen datos epidemiológicos de pocos países. En Brasil, los relevamientos serológicos publicados sugieren que BHV-1 se encuentra diseminado en diversos estados de este país, con prevalencias que oscilan entre el 30 y el 85 % (Bahía: 35 %; San Pablo: 42 %; Paraná: 54 %; Río Grande del Sur: 82 %, Minas Gerais: 66,2 %, Goiás: 81,5 %; Río de Janeiro: 81,5 %) [68]. En Colombia estos parámetros varían según la región del país observándose porcentajes de seropositividad de entre 13 % a más del 50 % [68]. En Chile se ha descrito que la presencia de reactores positivos en los rodeos es del 40 % [68].

En 1962 fueron descritos en Australia los primeros brotes fatales de encefalitis en bovinos producidos por causas virales [15, 2, 16]. Posteriormente, BHV-5 fue aislado a partir de cuadros de meningoencefalitis en Estados Unidos [17, 18], Argentina [19], y otros países de América y Europa [20, 21, 22, 23]. La prevalencia de BHV-5 se desconoce [31], siendo la aparición de estos cuadros esporádica.

1.6.2. Situación de BHV-1 y BHV-5 en Argentina

En Argentina, la aparición de los primeros casos clínicos presuntivos de IBR data de los años 60. Los primeros aislamientos se obtuvieron en 1972 a partir de un caso de carcinoma ocular y de un feto abortado [69]. En el año 1981 fue aislada y caracterizada la cepa L114, proveniente de un animal clínicamente sano y serológicamente positivo para BHV-1 [70].

En el primer relevamiento serológico, publicado en 1979, se detectaron anticuerpos específicos en los ocho establecimientos investigados, con porcentajes del 12 al 56 % de animales seropositivos [71]. En 1980 se presentó un estudio donde se analizaron sueros provenientes de Buenos Aires, Corrientes, Formosa, Santa Fe, Tucumán y Salta, determinándose la presencia de anticuerpos en un 56,9 % de las muestras [69]. Un trabajo de 1981, indicó que los índices de prevalencia aumentan progresivamente con la edad de los animales investigados (43,3 % en animales menores de dos años y 54,3 % en los de mayor edad) [72]. Datos más actuales de un relevamiento realizado en INTA en 1999 a partir de muestras de bovinos lecheros provenientes de las principales provincias productoras: Santa Fé, Córdoba y Buenos Aires; sugieren prevalencias de 55,53 %, 76,6 % y 68,18 % para estas provincias respectivamente (datos no publicados, ver A.1).

En 1982 fue descrito por primera vez en Argentina un brote de encefalitis en terneros. La observación de cuerpos de inclusión en neuronas, células gliales y la identificación por microscopía electrónica de estructuras similares a herpesvirus confirmó la etiología viral de la enfermedad [19, 73]. Estudios posteriores demostraron que las cepas argentinas de herpesvirus aislados de casos nerviosos correspondían a BHV-5 [7]. Desde entonces, BHV-5, es considerado como uno de los principales agentes etiológicos de enfermedad nerviosa en nuestro país [74].

Posteriormente, cepas aisladas en Chile, Brasil y Argentina fueron caracterizadas como BHV-5 mediante el uso de IP con anticuerpos monoclonales y electroforesis de las proteínas virales [75]. Además, mediante un estudio retrospectivo utilizando técnicas de hibridación in situ (HIS), realizado a partir de casos de encefalitis ocurridos en la provincia de Buenos Aires en un término de 29 años, fue posible establecer la presencia de BHV-5 en casos nerviosos registrados antes de la identificación de este agente [76].

1.7. Diagnóstico virológico

1.7.1. Generalidades del diagnóstico virológico

Los métodos diagnósticos de las infecciones virales pueden agruparse en 3 categorías:

- Detección de antígenos o estructuras virales a partir de células obtenidas de tejidos infectados, o libres en muestras de líquidos;
- Aislamiento e identificación del virus, habitualmente en cultivo de células;
- Demostración de un aumento significativo de anticuerpos séricos contra un virus etiológicamente plausible durante el curso de una enfermedad [77].

Además, los métodos pueden también clasificarse **directos** o **indirectos** [78, 38].

Los **métodos directos** son aquellos que permiten detectar la presencia del virus en las muestras clínicas. Un virus puede detectarse como agente infeccioso (AV), como partícula viral (microscopía electrónica, ME), por la identificación de sus antígenos mediante técnicas de inmunomarcación (IF e IP); por ensayos de fijación del complemento (FC), inmunodifusión en

gel de agar (IDGA), ELISA, *western blot* (WB), o bien por la detección de los genomas virales, mediante técnicas de hibridación o amplificación (PCR) [78, 38].

Los **métodos indirectos** se basan en la detección de anticuerpos específicos. Para poder hacer un diagnóstico virológico por medio de serología es necesario evidenciar la conversión serológica. También se puede diagnosticar determinando la presencia de IgM específica. Los métodos indirectos más comúnmente utilizados son la neutralización viral (NV), el ELISA para detección de anticuerpos y la IDGA [38].

Los métodos directos e indirectos se utilizan en forma complementaria, ya que unos resultan confirmatorios de los otros [38].

Las técnicas de AV son denominadas métodos convencionales. El AV en cultivos celulares es la técnica *gold estándar* [78]. La presencia del agente viral se evidencia, en general, por la aparición de efecto citopático (ECP). BHV-1 y BHV-5 producen redondeamiento, lisis y desprendimiento celular de la monocapa. El diagnóstico por AV se complementa con la NV, que permite la identificación del agente mediante el uso de un suero monoespecífico o un anticuerpo monoclonal antiBHV-1 o antiBHV-5 [78, 32].

El AV es muy confiable, pero lento, de alto costo, y de realización compleja, ya que se requiere un operador entrenado e infraestructura adecuada para el manejo de los cultivos celulares en esterilidad. Para determinar una muestra negativa se deben realizar dos pasajes ciegos de siete días cada uno. Otra desventaja es que en el espécimen pueden existir compuestos tóxicos para los cultivos de células que interfieren en el diagnóstico [78, 32].

En los últimos años, se han desarrollado métodos nuevos de diagnóstico virológico rápido (DVR), que permiten obtener el resultado en pocas horas. Estos métodos son fáciles de ejecutar y tienen en general menor costo, por no requerir del uso de cultivos celulares o animales de experimentación.

Los métodos de DVR consisten en la detección de partículas virales por ME, de antígenos por inmunomarcación (IP e IF) y de genomas virales por hibridación y PCR e IgM específica contra el virus [78].

La IF se utiliza comunmente en el análisis de improntas de tejidos o de hisopados. La IP puede ser usada para la detección del antígeno viral en los tejidos infectados, mediante improntas de los mismos, o en los pasajes por cultivos celulares. La sensibilidad de ambas técnicas, cuando no se recurre al uso de anticuerpos monoclonales, resulta menor que la del AV [32, 33, 34].

1.7.2. Diagnóstico de las enfermedades producidas por BHV

Los métodos que más se utilizan en el diagnóstico de las enfermedades producidas por BHV comprenden el AV, la NV y las técnicas inmunohistoquímicas (IF e IP).

La SN en cultivos, la HAP, la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y las pruebas inmunoenzimáticas (ELISA) son utilizadas para la detección de anticuerpos específicos contra BHV.

La SN es la determinación de referencia, sin embargo presenta la necesidad de contar con cultivos celulares [32]. Por otro lado, se ha demostrado que la HAP es más sensible con respecto a la IF. Numerosos estudios han demostrado que existe una correlación entre las técnicas de SN *vs.* IFI y de SN *vs.* ELISA, destacando una mayor sensibilidad para el ELISA [32, 35, 36].

1.7.3. Diagnóstico molecular

A partir de la hibridación de ácidos nucleicos, que permite la detección directa del material genético, ha surgido una nueva generación de métodos de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. El fundamento de la hibridación consiste en que la molécula de DNA está formada por dos cadenas complementarias, unidas entre sí por uniones tipo puente de hidrógeno. Estas dos cadenas pueden disociarse por temperatura o pH elevados (desnaturalización). En condiciones apropiadas, las cadenas pueden ser reasociadas para formar un dúplex estable. Esta reasociación es altamente específica³ y, por lo tanto, puede servir para la detección e identificación de muestras de DNA o RNA si se utilizan sondas⁴ adecuadas [38, 79].

La hibridación se puede realizar en fase líquida o utilizando un soporte sólido, siendo esta última la forma más utilizada. En este último caso, las moléculas de DNA de simple cadena se encuentran inmovilizadas sobre el soporte sólido, utilizándose en general membranas de

³Es decir que una hebra simple de DNA puede hibridarse exclusivamente con su cadena complementaria

⁴Fragmento de ácido nucleico complementario a DNA/RNA que se desea detectar.

nitrocelulosa o de nylon.

La HIS se realiza sobre cortes histológicos o células intactas [38]. Esta técnica presenta baja sensibilidad diagnóstica, dado que requiere de la presencia de $10^4 - 10^5$ copias de la secuencia blanco⁵. La cantidad de ácido nucleico en las muestras clínicas es en general más baja. Por esta razón no ha sido mayormente utilizada en los laboratorios de diagnóstico [79].

Durante los años 1985 y 1987, aparecieron los primeros reportes de la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [80, 81]. La PCR es un método enzimático que se utiliza para la amplificación *in vitro* de una secuencia específica de DNA, mediante la extensión simultánea de oligonucleótidos complementarios a las dos cadenas de DNA. De esta manera, en pocas horas se obtienen varios millones de copias de la secuencia *blanco*, si la misma está presente en la muestra.

Los oligonucleótidos, o cebadores⁶, se hibridan al DNA, constituyendo este paso de la técnica una hibridación en fase líquida. Los productos de la PCR pueden después ser rápidamente detectados e identificados mediante electroforesis en geles de agarosa [38].

1.8. Reacción en Cadena de la Polimerasa

1.8.1. Principios de la PCR

La PCR consiste en sintetizar repetidamente una parte seleccionada de una secuencia de DNA. El número de los fragmentos sintetizados directamente a partir de la muestra de DNA aumenta linealmente con cada ciclo de multiplicación. Además, los fragmentos que ya han sido sintetizados actúan a su vez como molde en los ciclos siguientes, lo cual resulta en un aumento exponencial en el número de copias.

Cada ciclo de amplificación consiste en tres pasos:

- Desnaturalización de la doble cadena de DNA por acción de la temperatura;
- Pegado de los cebadores (*primers*) a la cadena simple de DNA⁷. El *annealing* es, en esencia,

⁵Denominada comúnmente *secuencia target*.

⁶Denominados más comúnmente con la palabra inglesa *primers*.

⁷Este paso se denomina como *annealing*.

una hibridación en fase líquida. La temperatura utilizada se relaciona con la temperatura de *melting*⁸ (T_m) de los cebadores, siendo su determinación crucial para que la especificidad de la técnica sea adecuada;

- Síntesis del DNA, mediante el uso de una enzima polimerasa termorresistente.

Si el número de ciclos es n , como resultado de la amplificación se obtendrán un incremento exponencial del fragmento elegido de 2^n (si la cantidad de ciclos es de 30, la cantidad de fragmentos en el producto de amplificación podría ser de 1.073 millones). Sin embargo, debido a la disminución de la actividad de la enzima u otros componentes de la reacción, la amplificación se representa mejor mediante la fórmula $(1 + a)^n$, donde a representa la eficiencia de amplificación. El valor de a varía entre 0 y 1, dependiendo de las condiciones de la reacción, de la secuencia molde y de la enzima [38].

El producto de amplificación de la PCR puede: i- visualizarse en un gel de agarosa, ii- hibridarse con una sonda específica marcada (*Southern blot* del producto de PCR) o iii- amplificarse nuevamente (PCR anidada o *nested PCR*) [78].

La sensibilidad analítica de la PCR puede ser tan alta como para detectar 1-10 copias de la secuencia blanco [79].

Debido a su simplicidad, alta especificidad y sensibilidad, y a la posibilidad de automatización, esta técnica ha sido incorporada como herramienta en el diagnóstico de rutina en los laboratorios de virología [79].

1.8.2. Variantes de la PCR más aplicadas en el diagnóstico virológico

PCR anidada (*nested PCR*). El producto de amplificación de una PCR puede ser utilizado como molde en una segunda amplificación con el uso de un nuevo par de cebadores, los cuales hibridan internamente con respecto a los extremos 5' y 3' del producto amplificado por el primer par de *primers*. Esta estrategia permite incrementar la especificidad y, en especial, la sensibilidad de la técnica [78, 82].

⁸ T_m : es una medida de estabilidad de los híbridos definida como la temperatura a la cual el 50 % de los mismos se encuentran formados y el 50 % permanecen disociados.

RT-PCR. Debido a que la enzima *Taq DNA Polimerasa* usa sólo DNA como molde, la detección de secuencias de RNA viral requiere de la inclusión de un paso previo de transcripción reversa (RT) antes de la PCR. Para ello se utilizan enzimas que poseen actividad de transcriptasa reversa [79].

PCR cuantitativas. La cantidad de DNA amplificado puede ser cuantificado mediante la co-amplificación de cantidades definidas de un DNA estándar. Si los *primers* utilizados son los mismos para el DNA blanco y el control interno, y sus secuencias similares, estos pueden ser co-amplificados con la misma eficiencia. La razón entre la cantidad conocida del control interno y la cantidad de producto amplificado de ese control representa la eficiencia de la PCR, la cual permite calcular la cantidad de DNA blanco mediante la cuantificación del producto de amplificación del mismo [82, 79].

PCR Multiplex. Varias secuencias diana pueden ser simultáneamente amplificadas utilizando más de un par de *primers* en una misma reacción. Los productos de amplificación pueden ser diferenciados mediante el análisis del tamaño de los mismos. La PCR-M puede ser utilizada en el diagnóstico de agentes que producen un mismo tipo de sintomatología clínica, o para identificar diferentes tipos de agentes que no pueden ser diferenciados mediante técnicas de diagnóstico tradicionales, como ocurre con BHV-1 y BHV-5 [79].

PCR en tiempo real. Esta PCR se basa en la amplificación y detección simultánea de los productos amplificados. Para ello se utilizan termocicladores que tienen incorporado un lector de fluorescencia. Las químicas de fluorescencia que pueden utilizarse son: sondas de hidrólisis, sondas de hibridación o agentes que se unen a DNA. Este método es sumamente atractivo por su rapidez (puede obtenerse el resultado en pocas horas), sensibilidad y por permitir la cuantificación absoluta o relativa de un agente o porción genómica determinada (permite determinar la carga viral en una muestra).

1.9. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

El método de PCR-Multiplex puede ser utilizado como herramienta diagnóstica y diferencial entre BHV-1 y BHV-5.

Objetivo general

Desarrollar una técnica de diagnóstico rápido que permita detectar BHV-1 y BHV-5. Que el método además, permita diferenciar BHV-1 de BHV-5.

Objetivos particulares

- Reproducir de cuadros clínicos por BHV-1 y BHV-5 y obtener especímenes para diagnóstico bajo condiciones controladas.
- Diseñar de una PCR-Multiplex utilizando secuencias conocidas de BHV-1 y BHV-5.
- Caracterizar la PCR-Multiplex: análisis de sensibilidad y especificidad.
- Evaluar la técnica en distintas muestras clínicas.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1. Obtención de material biológico

2.1.1. Inoculaciones experimentales en bovinos

Preparación de los inóculos

Se utilizaron las siguientes semillas: cepa *Los Angeles* (LA) de BHV-1, cepa A663 de BHV-5 (ambas pertenecientes al cepario del Instituto de Virología, CICVyA-INTA-Castelar) y el aislamiento 97/613, proveniente del INTA-Balcarce, previamente caracterizado como BHV-5 por IP con anticuerpos monoclonales [75]. Estos virus se multiplicaron en frascos rotantes de cuatro litros con monocapa de MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) libres de BVDV (*Bovine viral diarrhea virus*), controladas por IF y RT-PCR¹. En cada caso, se inoculó 1 ml del virus semilla, se adsorbió una hora a 37°C y se agregó medio de mantenimiento: MEM-E (*Medio Esencial Mínimo-Eagle*, Gibco, cat. N°41500–083) suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB) irradiado (Internegocios), 10.000 UI/ml de penicilina, 6,6 mg/ml de estreptomina y 50 ug/ml de gentamicina. Este material fue incubado durante 24 – 48 horas a 37°C, dejando progresar la infección hasta que el 80% de la monocapa fue afectada por la aparición de efecto citopático ECP. El material se congeló a –80°C inmediatamente. Posteriormente se descongeló y se centrifugó a 3.000 g durante 20 minutos a 4° C para eliminar los restos celulares. Del sobrenadante se separó una alícuota

¹RT-PCR: Transcripción reversa seguida por amplificación mediante PCR.

para su titulación por infectividad en cultivo de tejidos por el método del punto final 50 % [83].

Diseño experimental

Las inoculaciones experimentales con BHV-1 y BHV-5 se realizaron en boxes de aislamiento de nivel de seguridad biológica 2 (NSB 2) con aire filtrado y presión negativa. En la Figura 2.1 de la página 29 se observa una imagen de estas instalaciones.

Los animales seleccionados para estas experiencias pertenecían al plantel del INTA y eran serológicamente negativos a BHV-1 por la técnica de ELISA [76] y por seroneutralización (SN).

En cada caso se utilizaron 6 bovinos de las razas Holando y Angus x Hereford; 4 de ellos fueron sometidos a la inoculación viral y los otros 2 se introdujeron en los días posteriores para que actuaran como controles de la transmisión por contacto (animales centinela).

Las edades de los bovinos en cada experiencia fueron diferentes. En la inoculación experimental de BHV-1 se utilizaron animales de 12 a 14 meses, mientras que en la inoculación realizada con BHV-5 los terneros tenían entre 5 y 7 meses.

Los inóculos se administraron individualmente, 2 ml en cada narina utilizando un nebulizador ultrasónico Electrolab AP 300 (ver las Figuras 2.2 y 2.3 en la página 29 y 30).

Una vez comprobada la finalización de la excreción viral, los animales fueron trasladados a un corral de aislamiento hasta los 40 días posteriores a la experiencia.

Inoculación experimental de BHV-1. Cuatro animales denominados 1, 2, 3, 4 fueron inoculados con la cepa LA de BHV-1 (título $10^{7,5} DICT_{50\%}/ml$). Dos días después de la inoculación, se introdujeron dos animales, denominados 5 y 6, como centinela. La Tabla 2.1 resume las características del diseño experimental. Las muestras de secreción nasal se tomaron a los 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 17 días post-inoculación (DPI). En los casos en que se observó conjuntivitis, se tomaron muestras de secreciones oculares mediante hisopado conjuntival. Las muestras de sangre fueron obtenidas los días 0, 7, 14, 21 y 40 DPI.

Inoculación experimental de BHV-5. Dos animales (15 y 16) fueron inoculados con la cepa A663 (título $10^7 DICT_{50\%}/ml$) y otros dos (17 y 18) con el aislamiento 97/613 (título

Tabla 2.1: *Diseño experimental: inoculación con BHV-1.*

Grupo	Animales	Tratamiento
Inoculados	1, 2, 3, 4	Día 1: inoculación
Centinela	5, 6	Día 3: ingreso al box

Tabla 2.2: *Diseño experimental: inoculación con BHV-5.*

Grupo	Animales	Tratamiento
Inoculados con cepa 663	15, 16	Día 1: inoculación
Inoculados con aislamiento Balcarce 2000	17, 18	Día 1: inoculación
Centinela	19, 20	Día 3: ingreso al box

10^7 $DICT_{50}$ %/ml). Dos días después de la inoculación, se introdujeron dos bovinos seronegativos (19 y 20) como contactos. En la Tabla 2.2 se muestran las características del diseño experimental. Los hisopados nasales se tomaron diariamente durante quince días. Se obtuvieron muestras de suero los días 0, 6, 9, 12, 15, 22 y 43 DPI. Se practicaron necropsias en los animales que presentaron signos nerviosos severos obteniéndose muestras en fresco de diferentes órganos (cerebro, ganglio trigémino, cerebelo, nasofaringe, tráquea, pulmón y bazo) para AV.

Evaluación clínica

Durante el desarrollo de las experiencias, los animales fueron evaluados clínicamente por un veterinario que no conocía el tratamiento. Los parámetros evaluados fueron anorexia, decaimiento, conjuntivitis, rinitis, vulvovaginitis, y aparición de síntomas nerviosos (marcha en círculos, bruxismo, opistótonos, pedaleo, convulsiones, etc.).

Se registró la temperatura corporal y se tomaron muestras de sangre y secreciones nasales antes de cada experiencia (para establecer los valores basales) y durante el transcurso de las mismas (para evaluar la respuesta inmune y la eliminación viral).



Figura 2.1: Imagen de los boxes de aislamiento: las instalaciones donde se mantuvieron los animales durante la experiencias cuentan con los elementos necesarios para la práctica de estas inoculaciones: pisos antideslizantes, luz natural, bebederos, comederos, un cepo para la sujeción de los animales, mesadas y lavatorios para las buenas prácticas de manejo.

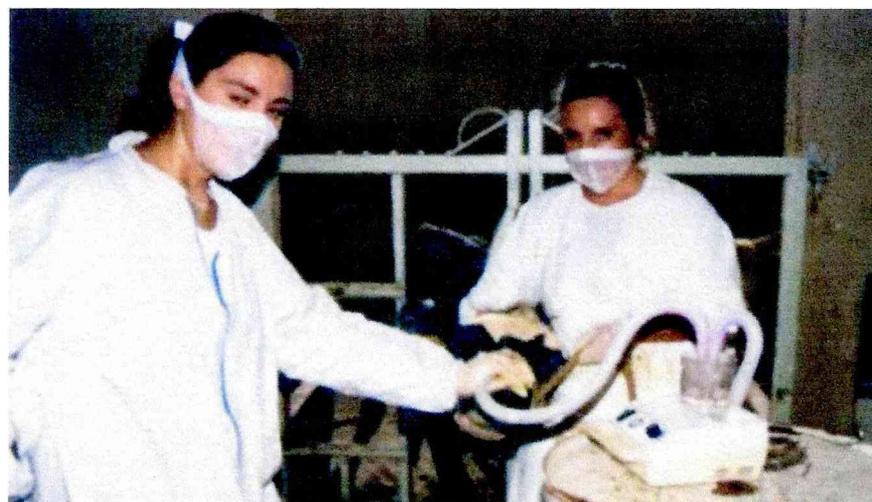


Figura 2.2: Inoculación viral: la inoculación se realizó de forma intranasal mediante la administración de 2 ml de inóculo en cada fosa nasal mediante la utilización de un nebulizador ultrasónico.



Figura 2.3: **Inoculación viral: aerosolización de la suspensión viral.**

Toma de muestras

Hisopados nasales. Las muestras de hisopados nasales se obtuvieron insertando hisopos en el meato ventral de la cavidad nasal. El medio de transporte utilizado para estas muestras fue MEM-E con antibióticos (5.000 UI/ml de penicilina, 2.500 ug/ml de streptomycin y 10 ug/ml de anfotericina B) y 2% de suero fetal bovino (SFB) irradiado (Internegocios). Los hisopos se agitaron vigorosamente al ser introducidos en el medio de transporte contenido en tubos cónicos de 50 ml. Posteriormente se centrifugaron a 1.500 g durante 10 minutos a 4°C, a efectos de clarificar el material. Parte del sobrenadante fue inoculado inmediatamente en monocapas de células MDBK y el resto fue guardado a -80°C.

Muestras de suero. El suero fue separado de la sangre mediante centrifugación a 125 g durante 20 minutos a 4°C, se fraccionó y se conservó a -20°C hasta su uso. La respuesta inmune se evaluó por SN y por la técnica de ELISA.

Evaluación de la excreción viral

Las secreciones se procesaron el mismo día de su recolección para realizar AV. Para ello, se inoculó 0,1 ml del fluido nasal sobre monocapas de MDBK (libres de BVDV, controladas por IF y RT-PCR) en placas de 24 pocillos (Corning Incorporated, cat. N°3524). Las monocapas

inoculadas se controlaron durante 3 días para observar la aparición de ECP característico de herpesvirus. Las muestras con ECP positivo fueron tituladas por el método del punto final 50 % según lo descrito anteriormente en esta sección. Las muestras con ECP negativo fueron sometidas a dos pasajes ciegos en monocapas de MDBK, en el último pasaje las células fueron crecidas sobre laminillas y analizadas mediante la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD).

Titulación viral: método del punto final 50 %

Para realizar esta titulación se utilizaron placas de 96 pocillos (Corning incorporated, cat. N°3599) con cultivos de células MDBK. Se efectuaron diluciones en base 10 del virus para calcular la dosis infectiva en cultivo de tejidos 50 % ($DICT_{50\%}$), que representa la dilución que produce efecto citopático en el 50 % de los cultivos celulares infectados [84, 83], interpolándose el punto final de acuerdo al método de infectividad de Reed y Muench modificado [83]. Las placas se incubaron durante 72 horas a 37°C.

Inmunofluorescencia directa. Las monocapas infectadas se fijaron con metanol absoluto durante 15 minutos a -20°C. Luego de tres lavados con buffer fosfato salino (PBS)², se agregó un suero policlonal de cabra anti-BHV-1 conjugado con fluoresceína (American Bioresearch Laboratories, cat. N°210-61) en una concentración 1 : 50 en PBS. Se incubó durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente las laminillas se lavaron y se tiñeron con Azul de Evans. El material se montó con glicerina tamponada y se observó en microscopio de fluorescencia.

Evaluación de la respuesta inmune

Seroneutralización. Se utilizó el método de cantidades variables de suero frente a cantidad constante de virus en microplacas de 96 pocillos de fondo plano (TPP Zellkultur Testplate 96F, cat. N° 92096). Los sueros fueron inactivados a 56°C durante 30 minutos; a partir de los mismos, se realizaron diluciones en base 4 y se mezclaron con 100 $DICT_{50\%}$ de virus según titulación previa. La mezcla suero-virus se incubó una hora a 37°C. Posteriormente, a la mezcla suero-virus

²PBS: fosfato de sodio 66 mM, NaCl 0,85 %, pH 7.

se le agregó una suspensión de células MDBK conteniendo 200.000 cél./ml. La lectura del efecto citopático (ECP) se realizó después de 72 horas de incubación a 37°C en atmósfera de CO₂. El título fue calculado por el método de Reed y Muench considerando como título neutralizante (TN) el logaritmo en base 10 de la inversa de la dilución más alta del suero que neutralizó el ECP específico producido por el virus.

ELISA

Obtención del antígeno El antígeno (Ag) viral se obtuvo mediante propagación de BHV-1 en frascos rotantes de 4 litros con monocapas de células MDBK (libres de BVDV, controladas por IF y RT-PCR), a una multiplicidad de infección (m.i.) de 0,1. Luego de 45 minutos de adsorción se le agregó medio de mantenimiento: MEM-E (Gibco, cat. N°41500 – 083) suplementado con 2% de SFB irradiado (Internegocios), 10.000 UI/ml de penicilina, 6,6 mg/ml de estreptomycinina y 50 ug/ml de gentamicina. Se incubó durante 24 – 48 horas hasta que el ECP fue confluyente. Para obtener células no infectadas, como control de Ag negativo, se incubaron frascos rotantes con monocapas de MDBK sólo con medio de mantenimiento. El material obtenido se congeló y descongeló 3 veces, para romper las células y liberar el antígeno. Esta suspensión viral fue clarificada a 3.000 g por 20 minutos a 4°C y, finalmente, el sobrenadante fue ultracentrifugado a 23.400 g durante 180 minutos. El *pellet* obtenido se resuspendió, en un volumen 100 veces menor que el material de partida, en buffer NET³ y se clarificó durante 2 minutos a 8.000 g. El mismo procedimiento se siguió para las células no infectadas. El material obtenido fue fraccionado en alícuotas para ser conservado a –80°C hasta su titulación y posterior utilización.

Titulación del antígeno. El Ag fue titulado mediante ELISA. Para ello, se efectuaron una serie de diluciones en base 2 del Ag viral y del control de Ag negativo. Las placas de 96 pocillos *Immulon I* (Dynatech Laboratories Inc., cat. N°011 – 010 – 3350) sensibilizadas con estas diluciones, fueron bloqueadas con buffer de bloqueo (BB)⁴. Luego, se incubaron en presencia de diluciones de un suero positivo y de un suero negativo. Posteriormente, fueron incubadas con

³Buffer NET: ClNa 0,1 M, TrisCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH:8.

⁴BB: (PBST-O 1%): Tween 20 0,01 %, ovoalbúmina 1 %, PBS 1 X.

un suero policlonal anti-Ig de bovino producido en cabra y conjugado con la enzima peroxidasa (KPL). Se añadió una solución reveladora de 2,2'-Azino-bis 3 etilbenzo-tiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS) en buffer citrato⁵. La absorbancia resultante fue leída a los 20 minutos a 410 nm de longitud de onda en un lector Dynatech MR 5000 Microplate Reader (Dynatech Laboratories, Inglaterra). La concentración óptima de antígeno a utilizar fue aquella que ofreció la mayor diferencia entre el Ag control y el Ag viral para el suero positivo y en donde las diferencias fueron nulas para el suero negativo.

ELISA indirecto para la detección de anticuerpos totales contra BHV-1. Básicamente se usó el método descrito por Bratanich y col. [35]. Se sensibilizaron placas de 96 pocillos *Immulon I* (Dynatech Laboratories Inc., cat. N°011 – 010 – 3350), en las filas pares con antígeno viral y en las filas impares con antígeno control (células no infectadas), diluidos en buffer de pegado (BP)⁶. Luego de una incubación de 12 horas a 4°C, las placas se lavaron 3 veces con PBST (buffer de lavado, BL)⁷ y se incubaron con BB durante 30 minutos en agitación constante a 37°C. Posteriormente, se agregaron los sueros a testear en diluciones en base 4 en PBST-O 1%, y además, los sueros control (positivo y negativo). Se incubó 30 minutos en agitación constante a 37°C y se repitieron los lavados. Luego se realizó una incubación con un suero policlonal anti-Ig de bovino producido en cabra y conjugado con la enzima peroxidasa (KPL), bajo las mismas condiciones que la incubación anterior. Finalmente las placas se lavaron 5 veces con BL, y se les añadió una solución reveladora de ABTS en buffer citrato⁸. La absorbancia resultante fue leída a los 20 minutos, luego del agregado de una solución de SDS⁹ 5%, a una longitud de onda de 410 nanómetros (nm), en un lector Dynatech MR 5000 Microplate Reader (Dynatech Laboratories, Inglaterra). Para cada suero se calculó la densidad óptica (DO) corregida (DO de las filas con el antígeno viral menos la DO de las filas con células no infectadas). Una muestra fue considerada positiva cuando su DO corregida superó en un 40% la DO del control positivo; y fue negativa

⁵ABTS 1 mM, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 0,015 %, ácido cítrico 0,055 M.

⁶BP: CO_3Na_2 15 mM, $CO_3 HNa$ 35 mM, pH 9,6.

⁷BL (PBST): Tween 20 0,01 %, PBS 1X, pH 7,4.

⁸ABTS 1 mM, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 0,015 %, ácido cítrico 0,055 M.

⁹SDS: Sulfato dodecyl de sodio

cuando su DO corregida fue menor al 20 % de la DO del mismo control. Las muestras fueron *dudosas* cuando la absorbancia corregida fue 20-40 % superior al control positivo. Los títulos se expresaron como el logaritmo de la inversa de la máxima dilución del suero cuya lectura fue considerada positiva.

2.1.2. Preparación de cantidades estándar de virus

Propagación de las semillas de virus

Se preparó un *batch* de cada especie viral para ser utilizados como material estándar (MaE) en la puesta a punto de la PCR Multiplex y como controles positivos de la obtención de DNA viral. Las semillas utilizadas fueron dos aislamientos obtenidos a partir de secreciones nasales de los animales inoculados experimentalmente. Para la preparación del MaE correspondiente a BHV-1 se usó el aislamiento obtenido a partir de la muestra del animal 6, 10 DPI y para el de BHV-5 la muestra del bovino 15, 4 DPI (ver en *Resultados* las Tablas 3.2 y 3.3 en pág. 52 y 54, respectivamente). Estos virus se multiplicaron en frascos rotantes de cuatro litros con monocapa de MDBK como se describe en el apartado 2.1.1. Se separaron alícuotas del sobrenadante de estos pasajes para ser titulados y caracterizados por técnicas moleculares. El resto se guardó a -80°C hasta su utilización.

Titulación viral. Los sobrenadantes fueron titulados por $\text{DICT}_{50\%}$ (ver protocolo en apartado 2.1.1, pág. 31), y por conteo de unidades formadoras de placas (UFP). La estimación de los títulos virales obtenidos en cada caso se muestra en la Tabla 2.3.

Caracterización molecular. El material correspondiente a cada pasaje fue caracterizado mediante PCR y secuenciación de los productos de amplificación (ver apartados 2.2.4 y 2.2.7 en las páginas 42 y 44, respectivamente).

Tabla 2.3: Estándares de BHV-1 y BHV-5: título viral.

Material Estándar	DICT ₅₀ %/ml	UFP/ml
BHV-1	10 ^{6,74}	6,5 x 10 ⁶
BHV-5	10 ^{4,8}	2,5 x 10 ⁴

DICT₅₀%/ml: dosis infectivas en cultivos de tejidos 50 % por ml, UFP/ml: unidad formadora de placas por ml.

Titulación por plaqueo

Se utilizaron placas de 24 pocillos (Corning Incorporated, cat. N°3524) con células MDBK (libres de BVDV, controladas por IF y RT-PCR) (200.000 cél/ml). Estas monocapas se infectaron con diluciones en base 10 del material a titular. Se incubó a 37°C durante 1 hora, para permitir la adsorción del virus a la célula. Se retiró el inóculo y se agregó 1 ml de MEM-E suplementado con 5,000 UI/ml de penicilina, 2.500 ug/ml de streptomycin y 10 ug/ml de anfotericina B y 2 % de SFB irradiado (Internegocios) y 2,5 % de metilcelulosa (Fluka cat. N°64625). Este material fue incubado durante 48 horas a 37°C. Posteriormente las monocapas fueron fijadas con una solución de formaldehído al 10 % durante 1 hora a temperatura ambiente. El medio de cultivo fue retirado y las células se tiñeron con solución de cristal violeta (cristal violeta 1 % en etanol 10 %). El título de la preparación viral se calculó contando el número de placas de lisis (entre 20 y 100) que se produjeron en una determinada dilución, y multiplicando la cantidad de placas por la inversa de esta última. El título se expresó en unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/ml)¹⁰.

2.1.3. Cepas virales para la evaluación de la especificidad

Con el fin de evaluar la especificidad de la PCR-M, se utilizaron 4 cepas de virus pertenecientes a la familia *Herpesviridae* y 3 de virus no relacionados. En la Tabla 2.4 se muestran los virus utilizados en este análisis.

¹⁰(UFP/ml)= n/v x d; donde n es el número de placas contadas, v es el volumen del inóculo, y d la dilución donde se realizó el conteo de las placas de lisis.

Tabla 2.4: **Virus utilizados para análisis de especificidad**

Virus relacionados	Virus no relacionados
<i>Equine herpesvirus 2</i>	<i>Bovine viral diarrhea virus</i>
<i>Equine herpesvirus 4</i>	<i>Bovine respiratory syncytial virus</i>
<i>Bovine herpesvirus 4</i>	<i>Bovine adenovirus 1</i>
<i>Porcine herpesvirus 1</i>	

2.1.4. Muestras clínicas

Hisopados nasales

Los hisopados nasales utilizados en la evaluación de la PCR-M, fueron aquellos obtenidos durante las inoculaciones experimentales de BHV-1 y BHV-5. Las mismas fueron tituladas (DICT 50%/ml) con el fin de determinar la curva de excreción viral para cada experiencia. Los detalles acerca de la obtención y la titulación de este material se indican en el apartado 2.1.1.

Muestras de órganos

Cerebros. Se utilizaron 21 muestras de cerebros provenientes de animales con sintomatología nerviosa que fueron enviados a nuestro laboratorio con fines diagnósticos.

Muestras obtenidas en la inoculación de BHV-5. A partir de las necropsias realizadas a los animales que murieron durante la inoculación experimental de BHV-5 se obtuvieron diferentes especímenes (pág. 28). Los tejidos obtenidos a partir de estos animales fueron: muestras de cerebro, ganglio trigémino, cerebelo, bazo, pulmón y tráquea del animal 16, y muestras de cerebro, ganglio trigémino, nasofaringe, tráquea y pulmón del animal 18.

Procesamiento de las muestras de órganos. A partir de este material se prepararon homogenatos que fueron utilizados en el diagnóstico. Se tomó una porción del órgano, de aproximadamente 1 gramo, que fue disgregada en un mortero con el agregado de arena estéril y 4 ml de MEM-E suplementado con 10.000 UI/ml de penicilina, 6,6 mg/ml de estreptomicina y 50 ug/ml de gentamicina. Posteriormente este material fue clarificado mediante centrifugación a 10.000 g

durante 30 minutos.

Las muestras así tratadas, fueron sometidas a dos pasajes ciegos en células MDBK (libres de BVDV, controladas por IF y RT-PCR), en placas de 24 pocillos. Cada determinación se llevó a cabo por duplicado. Luego se realizó un tercer pasaje en monocapas de células crecidas sobre laminillas. Al sexto día las laminillas fueron fijadas en acetona fría y guardadas a -20°C para ser caracterizadas posteriormente por IP con anticuerpos monoclonales [75]. Para ello se utilizó el protocolo de IP descrito por Suarez Heinlein et al. Básicamente, las laminillas se incubaron durante 20 minutos a 37°C , con los anticuerpos monoclonales 60 y 2915, específicos contra BHV-1 y BHV-5 respectivamente. Luego de 3 lavados con PBS, se realizó una segunda incubación durante 30 minutos a 37°C con un suero policlonal anti-Ig G de ratón conjugado con la enzima peroxidasa. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS y se realizó el revelado. El sustrato utilizado fue 3-amino carbazole (Sigma, cat. N° A4254). Una solución madre conteniendo este compuesto (3-amino carbazole, 0,08 M; n,n-dimetil-formamida, 5,6 %), fue utilizada para preparar la solución reveladora; para ello se disolvió al 6 % en buffer acetato (acetato de sodio, 0,035 M, pH 5) y se agregó peróxido de hidrógeno a una concentración final de 0,0034 %. Luego del agregado de la solución reveladora, se realizó una incubación a 37°C durante 15 – 20 minutos. Finalmente se lavó con PBS y el material fue analizado mediante su observación al microscopio óptico.

Muestras de semen

De acuerdo a la calidad del semen, las pajuelas de inseminación artificial provenientes de diferentes saltos de un animal, o de diferentes animales, presentan variaciones en la cantidad de crioprotector agregado. Por este motivo, se preparó una mezcla de 20 pajuelas con el objeto de estandarizar la cantidad de crioprotector presente en las muestras analizadas. Los crioprotectores son soluciones preparadas en base a proteína de origen animal, como yema de huevo, ovoalbúmina, leche, etc. Estas proteínas pueden actuar como inhibidores de la PCR.

Por otro lado, se utilizó una mezcla de semen fresco (sin agregado de crioprotectores) proveniente de dos animales seronegativos a BHV-1.

Tanto la mezcla de semen proveniente de pajuelas, como la de semen fresco, fueron analizadas

mediante tres pasajes ciegos de seis días de duración en cultivo de células MDBK e IFD, con el objeto de determinar su negatividad a la infección por BHV-1 (las determinaciones por IFD se realizaron según lo detallado en la pág 31). También fue evaluado por PCR no diferencial para BHV (apartado 2.2.4, pág. 42).

Posteriormente, a este material se le agregaron diferentes cantidades de BHV-1, para evaluar la capacidad de la PCR-M de detectar DNA viral en este tipo de muestras.

2.1.5. Aislamientos de campo

Para la evaluación de la PCR-M como herramienta diagnóstica, también fueron utilizados 18 aislamientos virales previamente identificados y caracterizados mediante la técnica de IP con anticuerpos monoclonales detallada anteriormente en la pág. 37, y por PCR no diferencial (ver apartado 2.2.4 en pág. 42).

2.1.6. Muestras para determinaciones estadísticas

Se utilizaron muestras de hisopados nasales correspondientes a las inoculaciones experimentales detalladas en la sección 2.1.1 (pág. 30) y muestras obtenidas a partir de experiencias controladas de inoculación o desafío viral con BHV-1 en bovinos [85].

2.2. Desarrollo de la PCR Multiplex

2.2.1. Selección de cebadores

Los cebadores (o *primers*) destinados a amplificar fragmentos de DNA específicos de BHV-5 (Tabla 3.4, pág. 56) se diseñaron a partir del análisis de secuencias disponibles en la base de datos *GenBank* (Bovine herpesvirus type 5 glycoprotein D gene: U14656, Bovine herpesvirus 5 glycoprotein C gene: U35883). El análisis termodinámico de los mismos se realizó con la ayuda del programa *Oligo 4.0*.

Se utilizaron además dos pares de *primers* previamente descriptos: TK-1/TK-2 [39] y O-1/O-2 [54], cuyas secuencias se detallan en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5: **Características de los primers obtenidos de bibliografía** [39, 54]. T_m (50mM de ClNa); US: upstream; DS: downstream. El primer upstream o sense corresponde a la cadena codificante, y el downstream o antisense a la cadena complementaria.

Primer	Secuencia	Posición	% GC	T_m
TK – 1	5'-AGACCCAGTTGTGATGAATGC-3'	US	50 %	55,30° C
TK – 2	5'-ACACGTCCAGCACGAACACC-3'	DS	60 %	55,63° C
O – 1	5GCATGCGCGAGCAGTTACTTT-3'	US	52,4 %	57,04° C
O – 2	5'-CGAGAGCTCGGCGCAGAAGA-3'	DS	65 %	60,36° C

Las secuencias de los oligonucleótidos fueron comparadas con todas las secuencias disponibles en *GenBank*, *EMBL Nucleotide Sequence Database (EMBL)* y *DNA Bank in Japan (DDBJ)* mediante la implementación *Blast (Blast Local Alignment Search Tool)* [86].

2.2.2. Obtención de DNA molde

Extracción con fenol cloroformo

El primer paso en la extracción de DNA con fenol-cloroformo, consistió en el agregado de 250 ul de buffer de extracción¹¹ a 250 ul de muestra. Esta mezcla se incubó durante 1 hora a 56°C. Posteriormente se agregaron 250 ul de fenol pH 7.9 y 250 ul de cloroformo: alcohol isoamílico (24 : 1). Se homogeneizó con vortex y se centrifugó a 12.000 g durante dos minutos para separar la fase acuosa de la orgánica. Se recuperó la fase acuosa y se agregó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24 : 1), se homogeneizó y centrifugó nuevamente para realizar una segunda separación. Se recuperó nuevamente la fase acuosa, y se agregó 0,1 volumen de NaAc 3 M (pH 5,8) y 2,5 volúmenes de etanol 100 %. Posteriormente el DNA fue precipitado mediante centrifugación a 12.000 g por 30 minutos. El *pellet* obtenido fue lavado con 1 ml de etanol 70 % y centrifugado a 12.000 g por 10 minutos. El sobrenadante fue retirado, el *pellet* fue secado al vacío a 40°C y resuspendido en 10 ul de agua bidestilada. Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su utilización.

¹¹Buffer de extracción: Tris 10 mM, EDTA disódico 1 mM, SDS 0,5 %, proteinasa K 50 ug/ml pH 7.8.

Utilización de resinas de intercambio iónico

La resina *Chelex 100* permite someter a las muestras a un procedimiento que involucra un tratamiento a temperaturas superiores a los 100°C¹². El *Chelex* actúa quelando iones metálicos polivalentes. Esto podría impedir la acción de ciertas nucleasas. Además permite obtener soluciones de DNA libres de iones, de manera tal que la concentración de los mismos en la reacción de PCR puede ser controlada eficientemente (por ejemplo, la concentración efectiva de Mg⁺⁺ será proporcional a la cantidad de Cl₂Mg incluida en el buffer de PCR).

Para el procesamiento con la resina *Chelex 100* (Bio Rad cat. N°143 – 2832), se trataron 25 ul de muestra en una solución de la resina al 5%. Además se agregó proteinasa K (Promega cat. N°V302B) hasta una concentración de 1 mg/ml y DTT (dithiothreitol) (Promega cat. N°V31519) hasta una concentración de 0,05 M. Esta mezcla se incubó a 56°C durante 45 minutos y se homogeneizó en vortex durante 10 segundos. Posteriormente se colocó en baño de agua hirviendo durante 8 minutos, luego de lo cual se aplicó una centrifugación de 30 segundos a máxima velocidad en microcentrífuga. El material se guardó a –20°C hasta su utilización. Este protocolo se desarrolló en base a modificaciones del trabajo publicado por Walsh y col. [87].

Pretratamiento de las muestras de semen

La obtención de DNA a partir de muestras de semen requirió de tratamientos diferentes con respecto a los especímenes utilizados para el diagnóstico por PCR.

Separadamente, se utilizó semen fresco y de pajuelas previamente caracterizados como negativos a la infección por BHV-1 y BHV-5 (para más detalles ver apartado 2.1.4), a los que se les agregó una cantidad conocida de virus.

Tratamiento previo a la extracción con fenol cloroformo. Un volumen de muestra fue clarificado a 13.000 g durante 3 minutos para obtener el plasma seminal, libre de células espermáticas. Luego se agregaron dos volúmenes de buffer de lisis¹³ y se incubó durante 1 hora

¹²La muestra se somete a un hervor de 8 minutos, a estas temperaturas el DNA normalmente se desnaturaliza.

¹³CiNa 0,15 M, Sodio Lauryl Sarcosine 0,75 %, Proteinasa K 1,5 mg/ml, esperma de salmón, SIGMA N°S – 3126, 10 ug/ml.

a 56° C. Luego, se agregó un volumen de solución de NaI 6 M [88]. Posteriormente se realizó la extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y la precipitación con etanol como se detalla en el apartado 2.2.2, (pág. 39).

Tratamiento previo a la utilización de resinas de intercambio iónico El semen fue clarificado a 13.000 g durante 3 minutos. Los componentes del plasma seminal fueron separados mediante el uso de una columna cromatográfica de Sephacryl *S* – 400 (Amersham Pharmacia cat. N°17 – 0609 – 10), preparada según Sambrook y col. (1989) [89]: en una jeringa de 1 ml de capacidad, se colocó lana de vidrio estéril con el fin de tapar el fondo de la misma, y se relleno con la resina Sephacryl *S* – 400 equilibrada con buffer NET¹⁴, este material fue compactado cuidadosamente para evitar la presencia burbujas de aire en su interior, que pudieran interferir en la separación de los componentes de la muestra. En el extremo de la columna se agregó un tubo de microcentrifuga como recipiente recolector y la columna así preparada fue colocada en un tubo cónico de 15 ml de capacidad. Posteriormente, se agregaron 100 ul de plasma seminal a la columna, y se centrifugó a 1.000 g durante 2 minutos a temperatura ambiente [90]. Luego, el material obtenido fue tratado con la resina *Chelex 100* según fue descrito en este apartado (pág. 40).

2.2.3. Reactivos y soluciones estándar

De todos los componentes de la PCR (*primers*, deoxirribonucleótidos, buffer de reacción, *Taq DNA Polimerasa*, cloruro de magnesio, agua y aditivos), sólo los *primers* debieron ser solubilizados; el resto de los componentes fueron adquiridos en solución. A continuación se detallan las características de los reactivos utilizados.

- *Primers*: se prepararon soluciones 10X (1 g/ml) que fueron separadas en alícuotas y guardadas a –80°C hasta su utilización;
- Deoxirribonucleótidos (dNTPs): a partir de soluciones 100 mM de cada deoxirribonucleótido se preparó una solución 25 mM de cada dNTP (Amersham Biosciences cat. N°27 –

¹⁴CiNa 0,1 M, Tris.Cl 10 mM, EDTA 1 mM, pH:8.

2035 – 01) y otra 1,25 mM de cada uno (Perkin Elmer cat. N°N808 – 0007);

- Enzima *Taq DNA Polimerasa*: se utilizaron enzimas de diferentes marcas (Gibco BRL/ Invitrogen, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA, cat. N°10342 – 020; Perkin Elmer, cat. N°N808 – 0161);
- Buffer de PCR(10X): 500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl, pH 8 (Gibco / Invitrogen); 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3 (Perkin Elmer);
- Solución de cloruro de magnesio: 50 mM $MgCl_2$ (Gibco BRL/ Invitrogen); 25 mM $MgCl_2$ (Perkin Elmer, Norwalk CT, USA);
- Agua tridestilada y esterilizada en autoclave;
- Aditivos de la reacción: dimetilsulfóxido (DMSO) (Merk cat. N°2931 – 1000), glicerol (Merk cat. N°4094).

2.2.4. PCR no diferencial: protocolo base

En el desarrollo de este trabajo de tesis se contó con una PCR no diferencial que fue utilizada como herramienta de control de los métodos de obtención de DNA realizados a partir de los diferentes especímenes que se utilizaron para evaluar el desempeño de la PCR Multiplex. También se utilizó en la caracterización de los MaE (2.1.2, pág. 34).

Para ello se ajustaron las condiciones de reacción para la amplificación de un producto de 336 pb mediante la utilización de los *primers* O-1/O-2 [54] dirigidos hacia una región del LR. Se utilizó un *protocolo de partida*. En base a este protocolo se realizaron modificaciones para optimizar la amplificación del DNA molde.

El *protocolo de partida* consistió de un precalentamiento (*Hot Start*) de 98°C durante 3 minutos de una preparación conteniendo el DNA molde, *primers*, DMSO, y agua bidestilada. El resto de los componentes de la reacción fueron agregados luego del *Hot Start* a una temperatura de 80°C. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 1,5 mM $MgCl_2$, 0,5 uM de cada *primer*, 20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl, 0,2 mM dNTPs, 10 % DMSO, 2,5 U de *Taq DNA*

Polimerasa en un volumen final de 30 ul. Estos componentes se sometieron a un tratamiento térmico de 1 minuto a 50°C, 1 minuto a 72°C; y luego 35 ciclos con las siguientes condiciones: 30 segundos a 94°C (desnaturalización), 1 minuto a 50°C (*annealing*), 1 minuto a 72° C (extensión). La extensión final se realizó durante 10 minutos a 72° C. El proceso se realizó en un termociclador *Perkin Elmer 2400*.

2.2.5. PCR Multiplex: protocolo base

Se utilizó un protocolo común para amplificar por separado los productos correspondientes a ambos tipos virales. Por un lado se utilizaron todas las combinaciones posibles de los *primers* diseñados específicamente para BHV-5 (Tabla 3.4, pág. 56), y por otro, se utilizaron los *primers* TK-1/TK-2 (Tabla 2.5, pág. 39) para obtener un producto de 183 pb específico de BHV-1.

En este protocolo se utilizó una mezcla conteniendo: 0,3 uM de cada *primer*, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM *MgCl₂*, 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl; 10% glicerol y 2,5 U de *Taq DNA Polimerasa* en un volumen final de 50 ul. El ciclado consistió en un precalentamiento (*Hot Start*) a 98°C durante 8 minutos de algunos de estos componentes (*primers* y DNA molde); luego de un descenso a 80°C se agregaron el resto de los reactantes. Posteriormente, se continuó con 30 ciclos que consistieron en: 1 minuto a 94°C (desnaturalización), 1 minuto a 61°C (*annealing*) y 1 minuto a 72°C (extensión). Finalmente, se realizó una extensión final de 4 minutos a 72°C. El proceso se realizó en un termociclador *Perkin Elmer 2400*. La temperatura de *annealing* de los cebadores fue la misma que la utilizada por Kibenge, et al [39]. En base a los resultados obtenidos a partir de estas PCR, se seleccionaron los *primers* de BHV-5 que fueron utilizados para el desarrollo de la PCR Multiplex.

2.2.6. Análisis de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis (30 minutos a 100 V) en geles de agarosa al 1,8% en buffer TBE 1X¹⁵ o buffer TAE 1X¹⁶. La detección de los mismos se

¹⁵Buffer TBE: Tris-borato 0,09 M, EDTA 0,002 M, pH 8.

¹⁶Buffer TAE: Tris-acetato 0,04, EDTA 0,001M, pH 8,2.

realizó por tinción con Bromuro de Etidio, incorporado en una concentración de 5 ug/ml en los geles.

El tamaño de los fragmentos amplificados se verificó por comparación con un marcador de peso molecular (100 *pb ladder*, Promega).

2.2.7. Secuenciación

Los productos de amplificación fueron purificados mediante el uso de un kit comercial (QIAquick, Qiagen cat. N°28104), y posteriormente analizados mediante electroforesis en gel de agarosa en presencia de patrones de masa (*Mass Ruller*, Promega) y marcador de peso molecular (*100 bp ladder*, Promega). Los productos purificados fueron secuenciados mediante el secuenciador ABI-373 del Servicio de Biología Molecular de Alta Complejidad del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola del Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, INTA-Castelar.

Las secuencias fueron analizadas mediante el programa *Blast* [86].

2.3. Detección de BHV-1 en semen

2.3.1. Aislamiento viral

Diagnóstico virológico clásico para muestras de semen (protocolo sugerido por la *Organización Internacional de Epizootias, OIE* [32]): se realizaron tres pasajes ciegos de seis días de duración. Para ello se utilizaron monocapas de células MDBK (libres de BVDV, controladas por IF y RT-PCR) (200.000 cél/ml) crecidas en placas de 24 pocillos (Corning Incorporated, cat. N°3524). El último pasaje fue realizado en monocapas crecidas sobre laminillas. Al sexto día las laminillas fueron fijadas y posteriormente analizadas por IFD siguiendo el protocolo descrito anteriormente en este capítulo (pág. 31).

2.3.2. PCR-M

El DNA molde se obtuvo mediante extracción con fenol-cloroformo y por tratamiento con *Chelex 100*. El material fue sometido a los pre-tratamientos correspondientes para cada caso (pág. 40). Posteriormente se realizó la detección de DNA viral por PCR Multiplex.

2.4. Análisis estadísticos

2.4.1. Diseño experimental

En el análisis estadístico de este trabajo se utilizaron dos grupos de datos (*Data set 1* y *Data set 2*) correspondientes a BHV-1 y BHV-5, respectivamente. Los mismos fueron obtenidos mediante la caracterización por AV y PCR-M de muestras provenientes de bovinos inoculados en experiencias controladas (apartado 2.1.6, pág. 38).

Los datos fueron agrupados en base a dos criterios: según el momento de la toma de la muestra durante la experiencia (día post-inoculación o día post-desafío: DPI/DPD), o bien según el individuo tratado (Animal) (Tablas 2.6 y 2.7).

Los animales centinela de las inoculaciones experimentales no fueron incluidos como datos en estos análisis.

2.4.2. Análisis no paramétricos

Concordancia: índice de Kappa

El test «kappa» es un método que permite estudiar el grado de concordancia que existe entre la caracterización o clasificación de unidades experimentales realizada en base a dos metodologías alternativas [91].

Las observaciones son clasificadas en un número determinado de clases, C . El estadístico de prueba, k , se define como:

Tabla 2.6: Inoculación experimental con BHV-1: Análisis mediante PCR-M y AV (Dataset-1).

ANIMAL	DPI/DPD															
	0		4		6		8		10		12		14		17	
	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E
1	N	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
2	N	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
3	N	N	P	P	P	P	P	P	P	P	N	P	N	P	N	
4	N	N	P	N	P	P	P	P	P	P	N	P	N	P	N	
7	N	N	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	
8	N	N	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	
9	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	
10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
11	N	N	P	N	P	P	P	P	P	P	N	P	N	N	N	
12	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
13	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
14	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

M: PCR Multiplex; E: efecto citopático; P: positivo; N: negativo; DPI/DPD: días post-infección / días post-desafío.

Tabla 2.7: Inoculación experimental con BHV-5: Análisis mediante PCR-M y AV (Dataset-2).

DPI	ANIMAL							
	15		16		17		18	
	PCR-M	ECP	PCR-M	ECP	PCR-M	ECP	PCR-M	ECP
0	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	P	P	P	P	P	N	N
2	P	P	P	P	P	N	P	P
3	P	P	P	P	P	P	P	P
4	P	P	P	P	P	P	P	P
5	P	P	P	P	P	P	P	P
6	P	P	P	P	P	P	P	P
7	P	P	P	P	P	P	P	P
8	P	P	P	P	P	P	N	N
9	N	N	P	P	P	P	P	P
10	P	N	N	P	N	N	P	P
11	P	P	P	P	N	N	N	N
12	N	N	N	P	N	P	P	N
13	N	N	N	N	N	N	P	P
14	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N

PCR-M: PCR Multiplex; ECP: efecto citopático; P: positivo; N: negativo; DPI: días post-infección.

$$k = \frac{\text{Concordancia observada} - \text{Concordancia esperada}}{1 - \text{Concordancia esperada}}$$

En términos formales:

$$\hat{k} = \frac{\sum_{i,j=1}^C \pi_{ij} - \sum_{i=1}^C \pi_i \sum_{j=1}^C \pi_j}{1 - \sum_{i=1}^C \pi_i \sum_{j=1}^C \pi_j}$$

Para el caso de dos métodos diagnósticos (i.e. PCR y AV) usados para clasificar muestras como positivas o negativas, $C = 2$. Los resultados pueden categorizarse según el siguiente esquema:

		PCR	
		(+)	(-)
AV	(+)	a	b
	(-)	c	d

Donde a es el número de animales positivos por ambos métodos, b es el número de positivos por AV pero negativos por PCR, c es el número de muestras positivas por PCR y negativas por AV y d es el número de resultados negativos por ambos métodos. A partir de esta tabla, el estadístico \hat{k} se obtiene de la siguiente forma:

$$\hat{k} = \frac{\frac{a+d}{N} - \left(\frac{a+b}{N} \times \frac{a+c}{N} + \frac{c+d}{N} \times \frac{b+d}{N} \right)}{1 - \left(\frac{a+b}{N} \times \frac{a+c}{N} + \frac{c+d}{N} \times \frac{b+d}{N} \right)}$$

La máxima concordancia corresponde a $\hat{k} = 1$. El valor $\hat{k} = 0$ se obtiene cuando $P_a = P_b = P_c = P_d$, es decir que la concordancia ocurre al azar. Cuando $\hat{k} = -1$ los datos son completamente discordantes (i.e. $a = d = 0$).

2.4.3. Análisis de agrupamiento

Se utilizaron las rutinas implementadas en el paquete de programas R (<http://www.r-project.org/>). La matriz que se muestra en la Tabla 3.12 fue recodificada como 0 (discordancia) y 1 (concordancia) para luego calcular distancias de Manhattan. A partir de estas distancias se utilizó la rutina `hclust` (con los parámetros por defecto) para obtener un dendrograma.

EJEMPLO:

A continuación se brinda un ejemplo utilizando una matriz simplificada. También se utiliza una medida de distancia y un algoritmo de agrupamiento más sencillo, con el objeto de facilitar la comprensión de la metodología:

- Supongamos que se tienen las siguientes observaciones:

	Animal				
	1	2	3	4	5
Día 1	C	D	C	C	D
Día 2	C	D	D	C	D
Día 3	D	D	D	D	D

- Definamos una medida de similitud sencilla:

$$Similitud = S = \frac{\# \text{ coincidencias}}{N}$$

, donde $\# \text{ coincidencias}$ corresponde al número de animales en los que se observa el mismo resultado (sea este C o D) y N es el número de animales.

- Las similitudes entre cada par de días serían:

$$S_{1-2} = \frac{4}{5}$$

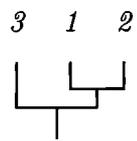
$$S_{1-3} = \frac{2}{5}$$

$$S_{2-3} = \frac{3}{5}$$

, lo cual implica que

$$S_{1-2} > S_{2-3} > S_{1-3}$$

- Entonces, el árbol que reflejaría dichas relaciones es:



Capítulo 3

Resultados

3.1. Inoculaciones experimentales

Las inoculaciones experimentales realizadas en esta tesis sirvieron para dos propósitos: i) reproducir los síntomas clínicos (especialmente para BHV-5), y ii) obtención de material biológico para la evaluación de la PCR-M.

Las inoculaciones, el estudio de la progresión de la enfermedad y el procesamiento del material obtenido, se realizó según lo descrito en la sección 2.1.1 (pág. 26).

A continuación se presentan los resultados obtenidos.

3.1.1. Inoculación experimental de BHV-1 en bovinos

Los animales inoculados con la cepa LA de BHV-1 y los que sirvieron como animales centinela fueron evaluados clínicamente durante el desarrollo de la experiencia.

A través de registros diarios de temperatura corporal, se observó que sólo uno de los animales inoculados con el virus (animal 1) presentó temperaturas superiores a 40° C. En el resto de los animales no se registró un aumento considerable de la misma.

El examen clínico reveló lesiones características de rinitis, puntos de necrosis en la mucosa del epitelio respiratorio y descarga nasal. La evaluación de la secreción nasal fue realizada sobre la base de un criterio de clasificación establecido al inicio de la experiencia: 0 (secreción nula),

Tabla 3.1: **Inoculación experimental con BHV-1: descarga nasal en cuatro tiempos de la experiencia (4, 8, 12, y 14 DPI).**

Secreción nasal	DPI			
	4	8	12	14
0	0	0	1	2
+	2	2	2	4
++	4	4	3	0

0: sec. nula, +: rinitis leve y sec. serosa,

++: rinitis, severa y sec. seromucosa.

+ (rinitis leve y secreción serosa); y ++ (rinitis severa y secreción seromucosa). La tabla 3.1 muestra la cantidad de animales que presentaron cada tipo de secreción en cada momento de la experiencia. Los animales inoculados presentaron rinitis seromucosa severa durante un período de 8 días. Los bovinos del grupo centinela desarrollaron conjuntivitis entre los días 10 y 14 PI. (Tabla 3.1).

A partir de muestras de secreción nasal se realizó aislamiento y titulación viral con el objetivo de establecer una curva de excreción viral. Los niveles de mayor excreción en los animales inoculados se observaron entre los días 6 y 8 PI, con un título medio de $10^{6,25}$ $DITC_{50\%}/ml$. Los animales centinela presentaron títulos mayores entre los días 10 y 14 PI, uno de ellos con un título de $10^{8,75}$ $DICT_{50\%}/ml$. Además, fue posible detectar virus en secreciones oculares el día 14 PI (Tabla 3.2).

La Figura 3.1 representa la curva de excreción viral obtenida a partir de los datos de la tabla 3.2. En el caso de los animales centinela (animales 5 y 6) los días 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18 DPI corresponden a los 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 DPE.

La respuesta serológica fue evaluada mediante ELISA indirecto y SN.

Los análisis realizados mediante ELISA evidenciaron la presencia de anticuerpos a partir del día 6 PI. En el día 14 PI los títulos fueron superiores a 3. Los mayores niveles de anticuerpos se observaron al día 40 PI. Estos valores se mantuvieron elevados durante toda la experiencia.

Los anticuerpos neutralizantes se detectaron a partir del día 6 PI en los animales inoculados con el virus, y en los animales centinela a partir del día 14 PI. En todos los casos, se alcanzaron

Tabla 3.2: Inoculación experimental con BHV-1: título viral en secreciones nasales.

Animal	Días post-inoculación							
	0	4	6	8	10	12	14	17
1	0	10 ^{5,1}	10 ^{5,75}	10 ^{5,25}	10 ^{3,1}	10 ^{2,25}	10 ^{1,75}	0
2	0	10 ^{3,1}	10 ^{5,0}	10 ^{6,25}	10 ^{5,5}	10 ^{3,1}	10 ^{2,25}	0
3	0	10 ^{3,1}	10 ^{6,5}	10 ^{4,5}	10 ^{2,25}	0	0	0
4	0	0	10 ^{5,5}	10 ^{6,5}	10 ^{6,0}	0	0	0
5	0	0	0	0	0	10 ^{2,5}	10 ^{6,5} /10 ^{4,5} **	10 ^{4,25}
6	0	0	0	10 ^{3,75}	10 ^{8,75}	10 ^{6,25}	10 ³ /10 ^{5,5} **	10 ^{2,25} /10 ^{3,1} **

* DICT₅₀ % por ml de fluido nasal. **(datos correspondientes a secreción ocular). En el caso de los animales centinela (5 y 6) los días 4,6, 8, 10, 12, 14 y 17 DPI corresponden a los 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 15 días post-exposición (DPE)

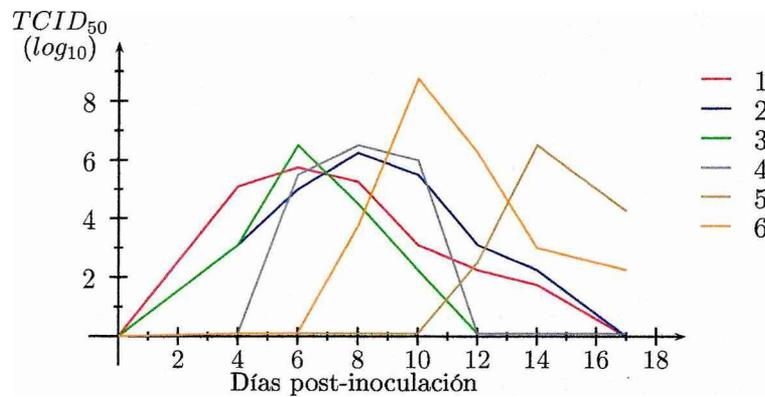


Figura 3.1: Curva de excreción viral correspondiente a BHV-1.

TN¹ superiores a 1,5 entre los días 21 y 40 PI. En la Figura 3.2 se muestra la curva de anticuerpos neutralizantes. Puede observarse que hubo seroconversión en todos los animales. Los datos de la SN fueron congruentes con los obtenidos mediante ELISA.

3.1.2. Inoculación experimental de BHV-5 en bovinos

Todos los animales sometidos a esta experiencia presentaron secreción nasal seromucosa a los 7 DPI, transformándose luego en mucopurulenta en todos los casos.

Transcurrida la primer semana post-inoculación, los animales mostraron síntomas clínicos inespecíficos como anorexia, decaimiento y apatía. A partir del día 12 PI los signos se acentuaron y

¹TN: ver explicación en el apartado 2.1.1.

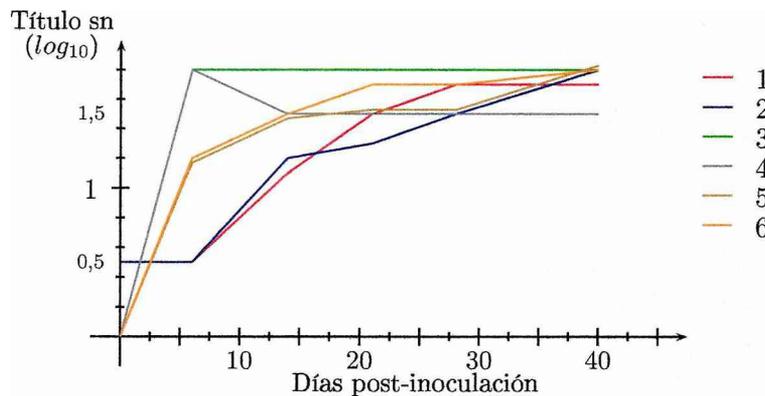


Figura 3.2: **Título de anticuerpos neutralizantes contra BHV-1.**

los animales presentaron sensibilidad exacerbada a los ruidos, ataxia y bruxismo, permaneciendo apoyados con la cabeza contra los bebederos y los rincones de la habitación.

En dos de los animales (16 y 18), el cuadro nervioso fue más evidente al finalizar la segunda semana, observándose aumento de la salivación, marcha en círculos, opistótonos, caída, convulsiones tónico-clónicas del tren posterior y muerte en menos de 24 horas de aparecidos estos signos. Fue posible aislar virus a partir de las muestras de cerebro y ganglio trigémino de estos animales.

Los registros diarios de temperatura corporal sólo mostraron temperaturas superiores a 40° C en los dos animales que murieron durante la experiencia. El bovino 16 registró su pico máximo (40,5° C) el día 13 PI, mientras que el 18 permaneció con valores superiores a esta temperatura durante 3 días (12 - 14 DPI).

A partir de los hisopados nasales recogidos diariamente, se realizó la determinación de la excreción viral mediante aislamiento y titulación. Los animales inoculados con el virus presentaron mayor excreción viral entre los días 4 y 5 PI, siendo su título promedio de excreción máxima de $10^{5,5} DICT_{50\%}/ml$. Los animales centinela excretaron mayor cantidad de virus entre los días 5 y 8 PI, siendo sus títulos máximos, mayores al promedio de los animales inoculados ($10^6 DICT_{50\%}/ml$).

La Tabla 3.3 muestra los valores obtenidos a partir de dichas titulaciones y la Figura 3.3 representa la curva de excreción correspondiente.

La respuesta inmune fue evaluada mediante la utilización de un ELISA indirecto y SN. Los

Tabla 3.3: **Títulos virales en secreciones nasales de bovinos inoculados experimentalmente con BHV-5.**
 En el caso de los animales centinela (19 y 20) el día 3 DPI corresponde al primer día post-exposición (DPE) y por consiguiente, el día 15 DPI, al 13 DPE.

DPI	Animal					
	15	16	17	18	19	20
0	0	0	0	0	0	0
1	10^1	$10^{0,74}$	$10^{1,74}$	0	0	0
2	$10^{4,5}$	$10^{3,75}$	0	$10^{2,39}$	0	0
3	$10^{5,33}$	10^5	$10^{4,33}$	$10^{4,39}$	10^1	0
4	$10^{6,33}$	$10^{5,33}$	10^5	$10^{4,66}$	$10^{3,5}$	10^2
5	$10^{5,33}$	$10^{5,5}$	$10^{5,5}$	10^5	$10^{4,5}$	$10^{1,5}$
6	10^5	$10^{4,5}$	$10^{4,39}$	$10^{4,66}$	$10^{6,33}$	$10^{1,5}$
7	$10^{4,33}$	$10^{4,5}$	$10^{4,66}$	10^2	10^6	$10^{5,5}$
8	$10^{2,66}$	10^3	$10^{2,5}$	0	$10^{6,33}$	$10^{5,5}$
9	0	10^3	$10^{1,5}$	$10^{2,5}$	$10^{5,5}$	$10^{5,66}$
10	0	$10^{1,33}$	0	$10^{2,33}$	$10^{5,33}$	10^4
11	$10^{0,66}$	$10^{1,33}$	0	0	$10^{4,5}$	$10^{1,5}$
12	0	10^1	$10^{1,33}$	0	10^4	0
13	0	0	0	$10^{2,5}$	$10^{1,5}$	0
14	0	0	0	0	$10^{1,66}$	0
15	0	0	0	0	0	0

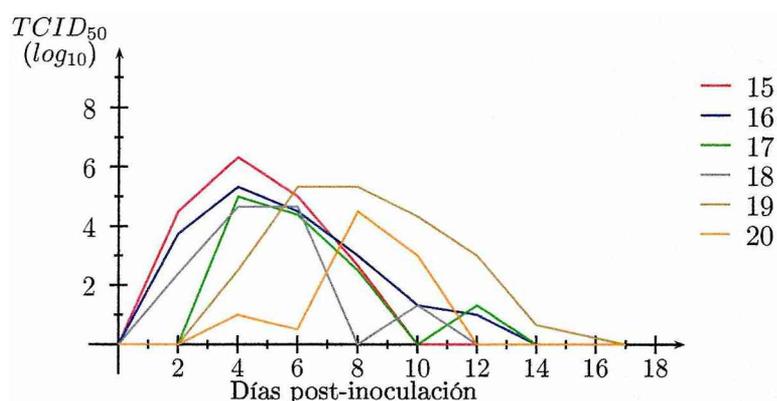


Figura 3.3: **Curva de excreción viral correspondiente a BHV-5.** El día 3 PI corresponde a 1 DPE.

anticuerpos aparecieron a partir del día 12 PI. Los bovinos de ambos grupos desarrollaron altos niveles de anticuerpos totales (títulos entre 2, 1 y 3, 1).

Los anticuerpos neutralizantes se detectaron a partir del día 12 PI y se mantuvieron a lo largo del resto de la experiencia. En la Figura 3.4 se indican los TN a distintos tiempos de la experiencia.

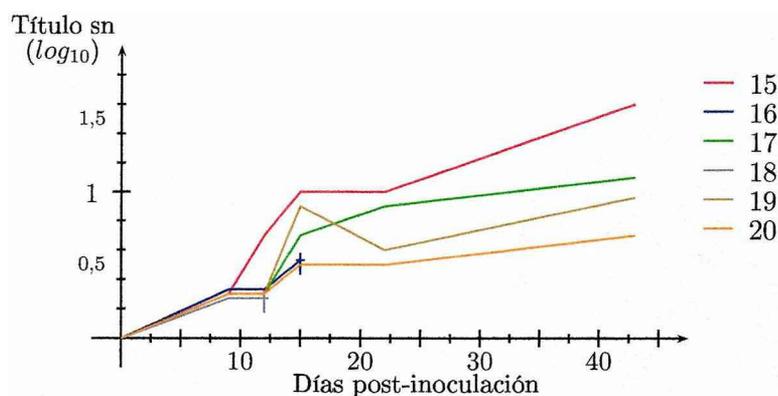


Figura 3.4: **Títulos de anticuerpos neutralizantes contra BHV-5.**

3.2. Desarrollo de la PCR Multiplex

3.2.1. Diseño y análisis de cebadores

Para el desarrollo de la PCR Multiplex fue necesario contar con un mínimo de dos pares de cebadores, de manera que fuera posible amplificar regiones específicas para cada especie viral

Tabla 3.4: **Primers diseñados en base a secuencias de BHV-5.**

Primer	Secuencia	Posición	%CG	T _m *
GC-1	5'-TGCCCCCGCCTTCGCTTTC-3'	181-199 US**	68,4%	63,87 °C
GC-2	5'-GCGTCTCGTCCGTCGTCGT-3'	314-333 DS***	68,4%	58,51 °C
GD-1	5'-CCC GCAGTTTCCCCTACC-3'	29-47 US	68,4%	58,04 °C
GD-2	5'-CGCACCCGCTCTCAATCTT-3'	574-592 DS	57,9%	55,18 °C
GD-3	5'-CCCGACGAGGCTATATACCC-3'	180-199 DS	60%	52,83 °C
GD-33	5'-CAGTTTCCCCTACCCCAACC-3'	34-54 US	61,9%	68 °C
GD-623	5'-AGTGCTTCTTGGGGTCGCACT-3'	614-643 DS	57,1%	66 °C
GD-632	5'-CAGTACCCGAAGTGCTTCTTG-3'	633-653 DS	52,4%	64 °C

*T_m (50 mM de ClNa). **US: upstream. ***DS: downstream. El *primer upstream o sense* es el diseñado en base a la cadena codificante, y el *primer downstream o antisense*, en base a la cadena complementaria. De manera que el primero hibrida con la cadena complementaria y el segundo con la codificante con respecto a las secuencia U35883 disponible en *GenBank*, en los primeros dos casos y a la U14656 en el resto.

(BHV-1 y BHV-5). Estos *primers*, además, debían flanquear segmentos de DNA de diferente largo, con el fin de obtener productos de PCR que resultasen fácilmente identificables mediante electroforesis en geles de agarosa.

Para la detección específica de BHV-1 y para la amplificación indistinta de secuencias correspondientes a ambas especies virales se utilizaron los pares de *primers* TK-1/TK-2 y O-1/O-2, respectivamente. Estos oligonucleótidos fueron obtenidos de trabajos publicados con anterioridad (Tabla 2.5, pág. 39). El primer par amplifica una región de 183 pb del gen de la *Timidina Kinasa* de BHV-1. Esta región presenta un alto grado de conservación entre BHV-1.1 y BHV-1.2, de manera que permiten detectar indistintamente a ambos subtipos. El par O-1/O-2 está dirigido a una región de 336 pb del LR (*Región Transcripcionalmente Activa Relacionada con la Latencia*), presente en ambos tipos virales [54]. Este par de cebadores se utilizó para caracterizar genética y taxonómicamente los aislamientos correspondientes al MaE de BHV-1 y BHV-5.

Los *primers* específicos para BHV-5 debieron ser diseñados.

Diseño de cebadores a partir de secuencias de BHV-5. Se diseñaron 8 oligonucleótidos, 2 dirigidos a la glicoproteína C (gC) y 6 a la glicoproteína D (gD) de BHV-5. En la Tabla 3.4 se detallan las características de cada uno de ellos.

Tabla 3.5: **Primers para detectar BHV-5: sus combinaciones.**

Primers	Secuencia amplificada	Largo del amplicón
GD-1/ GD-3	29 nt* -199 nt	170 pb**
GD-1 / GD-2	29 nt - 592 nt	563 pb
GD-1 / GD-623	29 nt - 643 nt	614 pb
GD-1 / GD-632	29 nt - 653 nt	624 pb
GD-33/ GD-3	34 nt - 199 nt	165 pb
GD-33/ GD-2	34 nt - 592 nt	558 pb
GD-33 / GD-623	34 nt - 643 nt	609 pb
GD-33 / GD-632	34 nt - 653 nt	629 pb
GC-1/ GC-2	181 nt - 333 nt	153 pb

*nt: nucleótidos; **pb: pares de bases.

En la Tabla 3.5 se indican las posibles combinaciones de estos *primers* así como la región genómica amplificada y el tamaño esperado de los amplicones.

Análisis mediante *Blast*. Los oligonucleótidos diseñados se compararon con todas las secuencias disponibles en *GenBank*, *EMBL* y *DDBJ*, usando el programa *Blast* (*Basic Local Alignment Search Tool*) [86]. Se observó que GD-33, GD-623 y GD-632 muestran similitud con secuencias de otros virus de interés veterinario; GD-33 podría hibridar con BVDB, mientras que GD-623 y GD-632 se alinearon significativamente con secuencias de *Bubaline herpesvirus 1* (BuHV-1).

Las secuencias de los restantes oligonucleótidos detallados en la tabla 3.4 sólo son similares a secuencias correspondientes a BHV-5. En ningún caso los *primers* diseñados presentaron semejanzas con secuencias correspondientes a BHV-1.

En el Anexo B.1 (pág. 103) se muestran los resultados del análisis con el programa *Blast* de los *primers* diseñados. En todos los casos se muestra una lista de los principales alineamientos y, más detalladamente, algunos alineamientos con secuencias no pertenecientes a BHV-5, de particular interés.

Los *primers* dirigidos a BHV-1, obtenidos a partir de bibliografía, también fueron analizados mediante el programa *Blast*. Los oligonucleótidos TK-1 y TK-2 mostraron una alta similitud con secuencias correspondientes a BHV-1 y no presentaron semejanzas con las secuencias de BHV-5 depositadas en *GenBank*, *EMBL* y *DDBJ*. Los *primers* O-1 y O-2 resultaron similares tanto a

secuencias de BHV-1 como de BHV-5.

En el Anexo B.2 (pág. 108) se detallan los resultados obtenidos a partir del análisis de los pares TK-1/TK-2 y O-1/O-2. En todos los casos se muestra sólo la lista de los principales alineamientos.

3.3. PCR no diferencial

3.3.1. Puesta a punto de la PCR no diferencial

Utilizando los *primers* O-1 y O-2, se realizaron modificaciones de un *protocolo base* (apartado 2.2.4, pág. 42) consistentes en variar la temperatura de pegado de los *primers* (*annealing*) y las condiciones del *Hot Start*.

En un principio se evaluaron las siguientes temperaturas de *annealing*: 46° C, 48° C, 50° C, 52° C, 54° C y 56° C. Junto con el producto de 336 pb esperado, aparecieron algunas bandas inespecíficas. Sin embargo, a 56° C, sólo se observó el producto de 336 pb. También se evaluaron temperaturas de 58 y 60° C, pero en estos casos no se obtuvieron productos de amplificación. Finalmente, utilizando una temperatura de 55° C, se obtuvo una mejor amplificación del producto específico, razón por la cual esta temperatura se utilizó en las experiencias siguientes.

Para en caso del precalentamiento (*Hot Start*) se evaluaron dos temperaturas, 93° C y 98° C. La utilización de 98° C durante la determinación de la temperatura de *annealing*, permitió obtener mayor definición del producto de 336 pb. y menor cantidad de bandas inespecíficas en los geles de agarosa. La duración del *Hot Start* fue extendida a 8 minutos, de esta manera se logró mayor repetibilidad.

3.3.2. Análisis de las secuencias de los amplicones

Los amplicones obtenidos con los *primers* O-1/O-2 fueron secuenciados. El análisis de estas secuencias permitió corroborar la identidad de la región genómica amplificada. Las secuencias correspondientes al aislamiento obtenido a partir de secreciones del animal 15 (inoculado con BHV-5) presentaron una similitud del 100 % con secuencias de BHV-5 disponibles en *GenBank*,

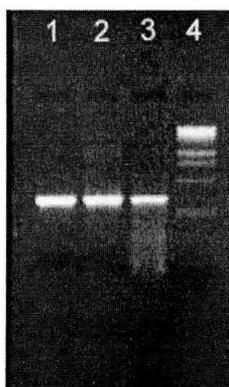


Figura 3.5: **Electroforesis de las PCRs no diferenciales:** obtención de los productos esperados (335 pb) utilizando 55° C como temperatura de annealing. Calle 1: amplificación de DNA obtenido a partir del MaE de BHV-1 (5uL); calle 2: amplificación de DNA obtenido a partir del MaE de BHV-5 (5 uL); calle 3: control de corrida (producto de una reacción anterior, 3uL); calle 4: marcador de peso molecular (100 pb ladder, Promega).

mientras que las secuencias correspondientes al aislamiento del animal 6 (inoculado con BHV-1) fueron iguales a secuencias correspondientes a BHV-1. La similitud entre estas secuencias es de 80 %.

Este análisis permitió corroborar la identidad taxonómica de los virus de referencia utilizados tanto en el ajuste de las técnicas moleculares como en las inoculaciones experimentales.

3.4. Puesta a punto de la PCR Multiplex

3.4.1. Evaluación de los *primers*

Todos los *primers* diseñados (Tabla 3.4, pág. 56) fueron evaluados con un protocolo común (apartado 2.2.5, pág. 43). En todos los casos, se utilizó una temperatura de *annealing* de 61° C. Bajo estas condiciones, no se obtuvieron productos de amplificación detectables en geles de agarosa cuando se utilizaron los pares GD-1/ GD-3, GD-33/ GD-3, GD-33/ GD-2, GD-33/ GD-623 y GD-33/ GD-632. En los demás casos (GC-1/GC-2, GD-1/GD-2, GD-1/GD-623 y GD-1/GD-632), se obtuvieron los productos de PCR esperados.

Los pares de *primers* correspondientes a la región gD (GD-1/GD-2, GD-1/GD-623 y GD-1/GD-632) fueron sometidos a un análisis comparativo. Para ello, se realizaron diluciones seriadas² a

²Las diluciones utilizadas fueron: 1/10, 1/100, 1/500, 1/1000, 1/1500, 1/2000, 1/5000 y 1/10000.

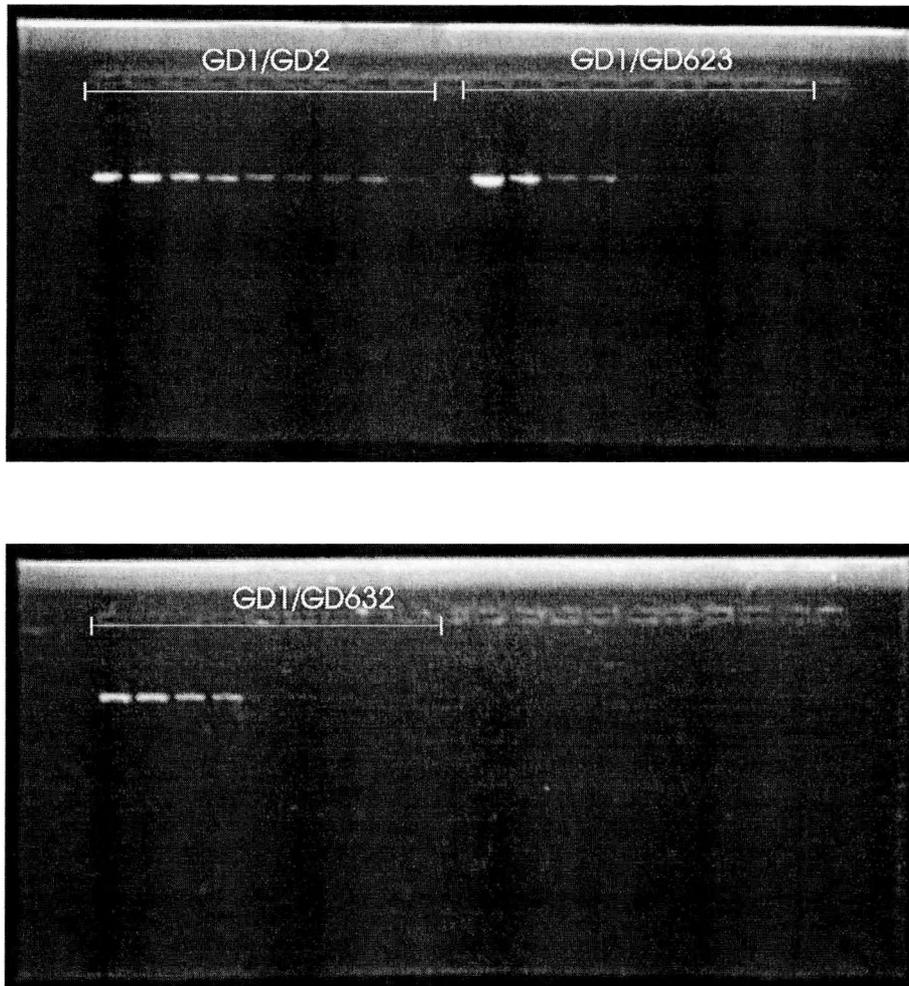


Figura 3.6: Evaluación de los pares de primers correspondientes a la gD de BHV-5. Panel superior: amplificación de DNA obtenido a partir de una serie de diluciones del MaE de BHV-5 utilizando los pares GD-1/GD-2 (izquierda) y GD-1/GD-623 (derecha). Panel inferior: evaluación del par GD-1/GD-632.

partir del MaE de BHV-5. Estas diluciones se sometieron a extracción fenólica, y el DNA obtenido se utilizó como molde para PCR. En la Figura 3.6, se muestran los resultados obtenidos a partir de la muestra pura, de las diluciones y, por último, del control negativo de cada reacción. Como puede observarse en la Figura, la sensibilidad fue mayor cuando el par utilizado fue GD-1/GD-2.

A pesar que tanto GC-1/GC-2 como GD-1/GD-2 resultaron los pares más adecuados para la amplificar productos específicos de BHV-5, fue elegido el par GD-1/GD-2, debido a que flanquea un segmento de mayor tamaño, permitiendo una mejor diferenciación con el producto correspon-

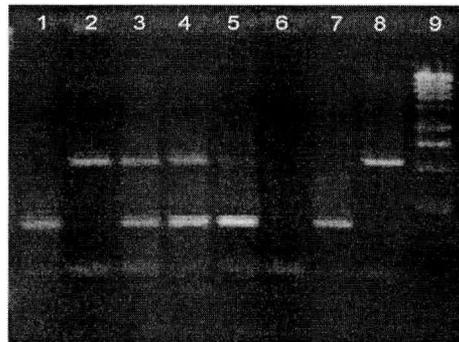


Figura 3.7: **PCR Multiplex: utilización del protocolo base.** Calle 1: producto de amplificación obtenido a partir de DNA de BHV-1; calle 2: producto de amplificación obtenido a partir de DNA de BHV-5. Calles 3-5: diferentes relaciones molares de DNA de BHV-1 y BHV-5 (1:5, 1:1 y 5:1, respectivamente); calle 6: control negativo; calle 7: control positivo (BHV-1); calle 8: control positivo (BHV-5); calle 9: marcador de peso molecular (100 pb ladder, Promega).



Figura 3.8: **Optimización de la PCR Multiplex.** Calle 1: marcador de peso molecular (100 pb ladder, Promega); calle 2: PCR-M a partir del MaE correspondiente a BHV-1; calle 3: PCR-M a partir del MaE correspondiente a BHV-5; calle 4: control negativo de PCR.

diente a BHV-1 en geles de agarosa.

3.4.2. Optimización de la PCR-M

Una vez seleccionados los cebadores según lo descrito en el apartado anterior, se optimizaron las condiciones del ciclado y las concentraciones de los reactivos a partir del *protocolo base*. En la Figura 3.7 se observan productos de amplificación obtenidos mediante el uso del protocolo base. En la figura 3.8 se muestran los productos de amplificación obtenidos luego de la optimización de diferentes parámetros de la reacción.

A continuación se detallan los procedimientos realizados.

Temperatura y tiempo de *annealing*. Este parámetro se evaluó en dos etapas. En la primera se utilizaron temperaturas entre 59 y 63°C, con diferencias de un grado entre ellas. Posteriormente, se analizó el rango de temperaturas fue 60,8 - 61,4° C, con diferencias de 0,2 grados. La temperatura óptima de *annealing* fue de 61,4° C. A esta temperatura fue posible compatibilizar la amplificación de los productos específicos de cada virus, evitando la aparición de bandas inespecíficas y obteniendo buen rendimiento en cada caso.

Se utilizaron tres tiempos de *annealing* diferentes: 30 seg., 45 seg., 60 seg. Debido a que no se observaron diferencias en los productos de amplificación, se eligió el menor de éstos, reduciéndose de esta manera el tiempo total de la reacción.

Temperatura y tiempo de extensión. Se evaluaron diferentes temperaturas (65° C y 72° C) y tiempos de extensión (30 seg., 45 seg., y 60 seg.). Se seleccionó una temperatura de 72° C con un tiempo de extensión 1 minuto.

Concentración relativa de los cebadores Se ajustaron las concentraciones y relación molar de cada par. Para ello, se combinó el uso de cantidades constantes de TK-1/TK-2 con cantidades variables del par GD-1/GD-2. Las concentraciones evaluadas fueron: 0,2, 0,25, 0,3, 0,35 y 0,4 uM. Se estableció que la concentración óptima para el par TK-1/TK-2 fue de 0,3 uM, en combinación con 0,35 uM del par GD-1/GD-2.

3.5. Caracterización de la PCR Multiplex

3.5.1. Especificidad

La especificidad se evaluó aplicando la técnica a cepas de referencia de virus DNA y RNA de diferentes especies virales no relacionadas y de otros miembros de la familia *Herpesviridae* (Tabla 2.4, pág. 36). En ningún caso hubo amplificación cuando se utilizó como molde ácidos nucleicos extraídos a partir de estos agentes.

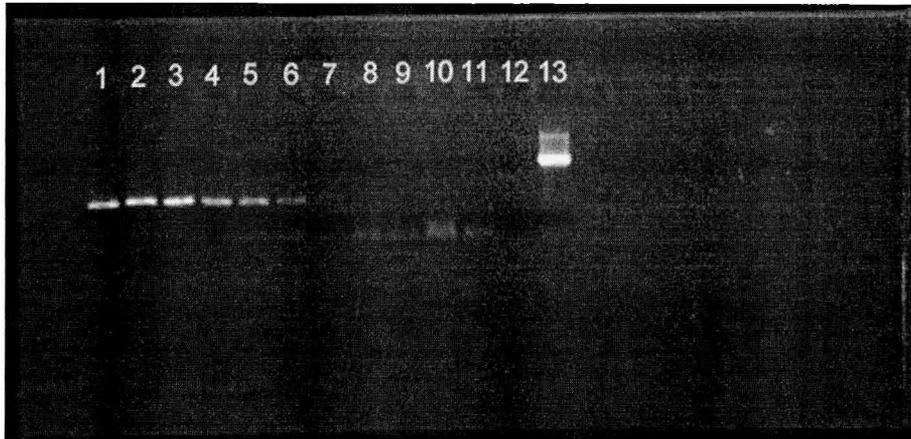


Figura 3.9: **Sensibilidad de la detección de BHV-1 luego de la extracción fenólica de DNA.** Calle 1: PCR-M a partir del MaE de BHV-1, calles 2-11: PCR-M a partir de diluciones decrecientes del MaE de BHV-1, calle 12: control negativo de PCR, calle 13: control positivo de PCR (MaE de BHV-5).

3.5.2. Sensibilidad

Se evaluó el límite de detección de la PCR-M con cada tipo viral. Los resultados fueron comparados con la sensibilidad de la detección por AV.

Para evaluar la sensibilidad de la prueba, se realizaron diluciones en base diez a partir del MaE correspondiente a BHV-1 y BHV-5 (apartado 2.1.2, pág. 34). Estas diluciones fueron inoculadas en células MDBK para evaluar la aparición de ECP, y fueron utilizadas para la obtención de DNA viral mediante extracción con fenol-cloroformo y tratamiento con resinas de intercambio iónico (*Chelex 100*).

Detección de BHV-1. Fue posible observar ECP hasta la dilución 10^{-6} . Mediante PCR-M los análisis fueron positivos hasta la dilución 10^{-7} cuando el DNA se obtuvo con el tratamiento con fenol-cloroformo y hasta 10^{-8} cuando el molde fue obtenido utilizando el tratamiento con *Chelex 100*. En las figuras 3.9 y 3.10 se observa en análisis de los productos de PCR correspondientes mediante electroforesis en geles de agarosa.

Detección de BHV-5. El ECP fue observado hasta la dilución 10^{-5} . La detección por PCR fue posible hasta la dilución 10^{-3} cuando el DNA utilizado como molde fue el obtenido mediante el uso de fenol-cloroformo. Con el material tratado con la resina *Chelex 100* pudieron observarse

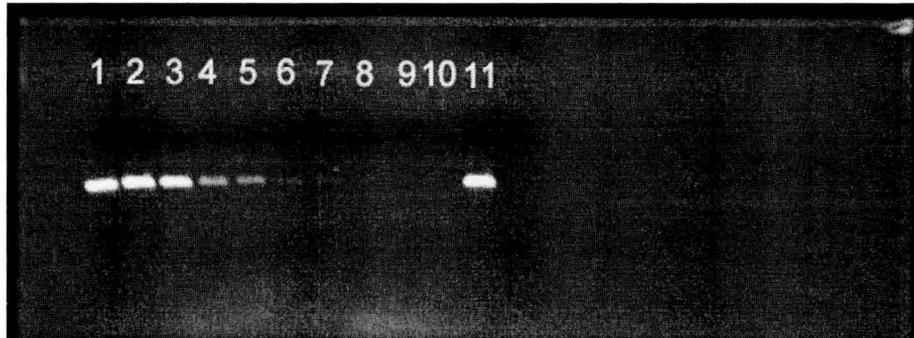


Figura 3.10: **Sensibilidad de la detección de BHV-1 luego del tratamiento con Chelex 100.** Calle 1: PCR-M a partir del MaE de BHV-1, calles 2-9: PCR-M a partir de diluciones decrecientes del MaE de BHV-1, calle 10: control negativo de PCR, calle 11: control positivo de PCR (MaE de BHV-1).

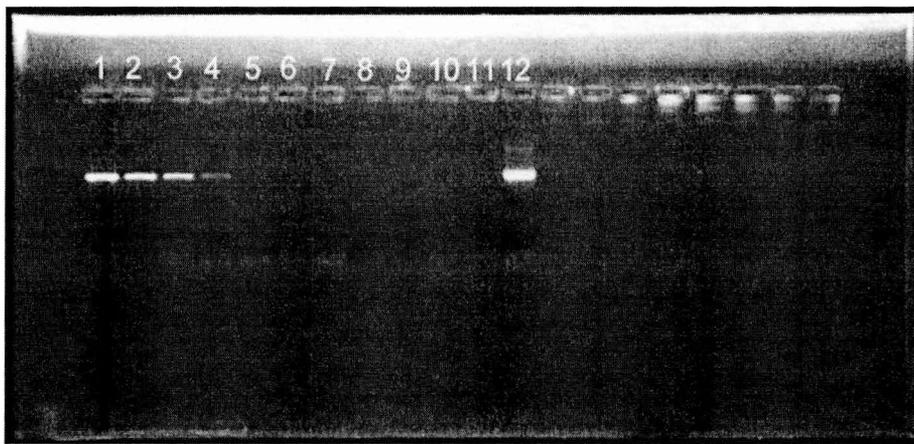


Figura 3.11: **Sensibilidad de la detección de BHV-5 luego de la extracción fenólica de DNA.** Calle 1: PCR-M a partir del MaE de BHV-5, calles 2-10: PCR-M a partir de diluciones decrecientes del MaE de BHV-5, calle 11: control negativo de PCR, calle 12: control positivo de PCR (MaE de BHV-5).

productos de amplificación hasta la cuarta dilución (10^{-4}) (Figuras 3.11 y 3.12).

Resumen. En la Tabla 3.6 se resumen los datos obtenidos a partir de la determinación de sensibilidad para cada tipo viral, y para los dos métodos de obtención de DNA molde.

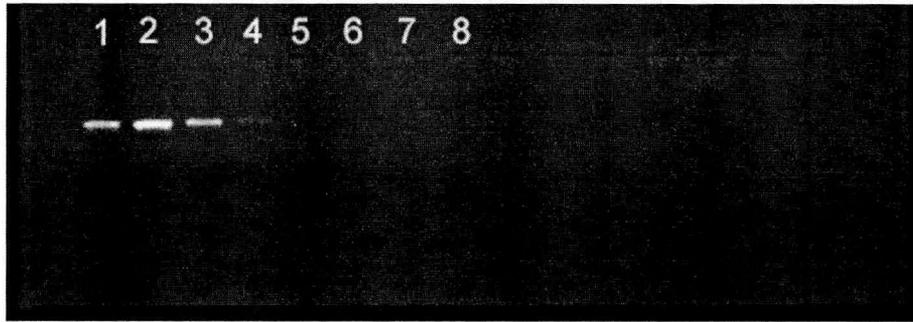


Figura 3.12: **Sensibilidad de la detección de BHV-5 luego del tratamiento con Chelex 100.** Calle 1: PCR-M a partir del MaE de BHV-5, calles 2-8: PCR-M a partir de diluciones decrecientes del MaE de BHV-5. No fueron incluidos los controles de PCR en la foto.

Tabla 3.6: **Análisis de la sensibilidad de la PCR-M.**

	UFP	DICT ₅₀ %	ECP	F/C	Chelex 100
BHV-1	$6,5 \times 10^6$	$10^{7,4}$	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
BHV-5	$2,5 \times 10^4$	$10^{4,8}$	10^{-4}	10^{-3}	10^{-4}

UFP: Unidad formadora de placa; DICT₅₀%: Dosis infectivas 50 % en cultivo de tejido; ECP: Efecto citopático; F/C: Fenol-Cloroformo

3.6. Aplicación de la PCR-M en la detección y tipificación de BHV en muestras clínicas

En todas las determinaciones realizadas en la evaluación de la PCR-M se utilizó DNA obtenido mediante extracción con solvente orgánico (fenol/cloroformo) y la resina de intercambio iónico (*Chelex 100*).

3.6.1. Hisopados nasales

Las muestras de hisopados nasales obtenidos a partir de los animales inoculados experimentalmente con BHV-1 y BHV-5 en las experiencias descritas en el apartado 2.1.1, y analizados previamente por aparición de efecto citopático (ECP) (apartados 3.1.1 y 3.1.2) fueron analizadas mediante PCR Multiplex. En total, debieron realizarse 300 determinaciones.

Tabla 3.7: **PCR-M en hisopados nasales.** Análisis de muestras provenientes de animales inoculados con BHV-1 mediante PCR-M.

Animal	Método	Días post-inoculación							
		0	4	6	8	10	12	14	17
1	PCR-M (F-C)	N	P	P	P	P	P	P	N
	PCR-M (Chelex 100)	N	P	P	P	P	P	P	P
	ECPb	N	P	P	P	P	P	P	N
2	PCR-M (F-C) ^a	N	P	P	P	P	P	N	N
	PCR-M (Chelex 100)	N	P	P	P	P	P	P	P
	ECP	N	P	P	P	P	P	P	N
3	PCR-M (F-C)	N	P	P	P	P	P	P	N
	PCR-M (Chelex 100)	N	P	P	P	P	P	P	P
	ECP	N	P	P	P	P	N	N	N
4	PCR-M (F-C)	N	N	N	P	P	N	N	N
	PCR-M (Chelex 100)	N	P	P	P	P	P	P	P
	ECP	N	N	P	P	P	N	N	N
5	PCR-M (F-C)	N	N	N	N	N	P	P/P#	P
	PCR-M (Chelex 100)	N	N	P	P	P	P	P/P#	P
	ECP	N	N	N	N	N	P	P/P#	P
6	PCR-M (F-C)	N	N	N	P	P	P	P/P#	P/P#
	PCR-M (Chelex 100)	N	P	P	P	P	P	P/P#	P/P#
	ECP	N	N	N	P	P	P	P/P#	P/P#

a- F-C: fenol-cloroformo; b- ECP: efecto citopático; P: resultado positivo; N: resultado negativo; # muestra de hisopado ocular

Muestras correspondientes a la inoculación experimental con BHV-1. Los resultados obtenidos a partir de las muestras correspondientes a BHV-1 mostraron que la PCR-M permitió detectar DNA viral en todos los casos en los que el ECP fue positivo. Sobre un total de 51 muestras analizadas, en 16 casos los resultados no fueron coincidentes en las tres determinaciones a las que fueron sometidas: 14 muestras resultaron positivas sólo por PCR-M (12 con el uso del tratamiento con *Chelex 100* y 2 por los dos métodos de obtención del DNA). En dos casos (animal 2, 14 DPI y animal 4, 6 DPI), las muestras fueron positivas mediante ECP y PCR-M sólo cuando se utilizó *Chelex 100*. Estos resultados se detallan en la tabla 3.7.

Muestras correspondientes a la inoculación experimental con BHV-5. De un total de 96 muestras analizadas en esta experiencia, 74 mostraron resultados coincidentes por los tres

Tabla 3.8: Análisis de hisopados provenientes de animales infectados con BHV-5.

DPI	Animal																	
	15			16			17			18			19			20		
	F	C	E	F	C	E	F	C	E	F	C	E	F	C	E	F	C	E
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	P	N	P	P	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	P	P	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P	N	N	N	N	N	N
3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N	P	N	N	N
4	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
5	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N	P
6	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N	P
7	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
8	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	N	N	P	P	P	P	P	P
9	N	N	N	N	P	P	N	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P
10	N	P	N	N	N	P	N	N	N	N	P	P	P	P	P	P	P	P
11	N	P	P	N	P	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	P	P	P
12	N	N	N	N	N	P	N	N	P	N	P	N	P	P	P	N	N	N
13	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	P	N	N	N
14	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

F: fenol-cloroformo; C: Chelex; E: efecto citopático; P: positivo; N: negativo; DPI: días post-infección.

tratamientos.

Entre las 22 restantes, 10 muestras fueron positivas por ECP y por PCR-M con el uso de la resina quelante (15, 11 DPI; 16, 1 DPI; 16, 8 DPI; 16, 9 DPI; 16, 11 DPI; 17, 1 DPI; 17, 9 DPI; 18, 9 DPI; 18, 10 DPI; 18, 13 DPI), 9 muestras resultaron positivas sólo por ECP (15, 1 DPI; 16, 10 DPI; 16, 12 DPI; 17, 12 DPI; 19, 3 DPI; 19, 13 DPI; 19, 14 DPI; 20, 5 DPI; 20, 6 DPI) y 3 sólo por PCR-M. Una muestra fue positiva por los dos métodos de obtención de DNA (17, 2 DPI) y 2 fueron positivas únicamente con el tratamiento con *Chelex 100* (15, 10 DPI; 18, 12 DPI).

En la tabla 3.8 se describen en detalle estos resultados.

Tabla 3.9: **Inmunodetección y PCR-M en muestras de cerebro** Análisis de muestras de cerebro de animales con sintomatología nerviosa.

Aislamiento	Ac 60	Ac 2915	PCR-TK ^a	PCR-GD ^b	Tipo
725	-	-	-	-	-
726	-	-	-	-	-
727	-	-	-	-	-
728	-	-	-	-	-
729	-	-	-	-	-
730	-	+	-	+	BHV-5
731	-	-	-	-	-
732	-	-	-	-	-
733	-	-	-	-	-
734	-	-	-	-	-
735	-	-	-	-	-
736	-	-	-	-	-
737	-	-	-	-	-
738	-	-	-	-	-
739	-	-	-	-	-
740	-	+	-	+	BHV-5
741	-	-	-	-	-
742	-	-	-	+	BHV-5
743	+	-	+	-	BHV-1
744	-	-	-	-	-
745	-	-	-	-	-

Ac: IP con anticuerpos monoclonales; PCR-TK: PCR con *primers* TK1/TK2; PCR-GD: PCR con *primers* GD1/GD2

3.6.2. Muestras de órganos

Muestras de cerebros. Sobre un total de 21 muestras de cerebro analizadas (apartado 2.1.4), sólo tres (730, 740 y 743) fueron positivas por AV y por IP. Mediante el uso de la PCR-M fue posible detectar cuatro muestras positivas (730, 740, 742 y 743), tanto a partir de DNA extraído con el uso de fenol-cloroformo como con la resina quelante. Tres muestras fueron caracterizadas como BHV-5 y una como BHV-1.

Estas determinaciones se detallan en la tabla 3.9.

Tabla 3.10: **Inmunodetección y PCR en aislamientos de campo.** Caracterización mediante ECP-IP con anticuerpos monoclonales y PCR-M.

Aislamiento	Ac 60	Ac 2915	PCR-TK ^a	PCR-GD ^b	Tipo
45075	+	-	+	-	BHV-1
45090	+	-	+	-	BHV-1
26/96	+	-	+	-	BHV-1
59960	+	-	+	-	BHV-1
60767	+	-	+	-	BHV-1
20285	+	-	+	-	BHV-1
U2000	+	-	+	-	BHV-1
B2000	+	-	+	-	BHV-1
4 – 2000	+	-	+	-	BHV-1
22 – 2000	+	-	+	-	BHV-1
34 – 2000	+	-	+	-	BHV-1
SS – 1	+	-	+	-	BHV-1
119	-	+	-	+	BHV-5
25/95	-	+	-	+	BHV-5
54722	-	+	-	+	BHV-5
405	-	+	-	+	BHV-5
94/100	-	+	-	+	BHV-5
97/613	-	+	-	+	BHV-5
7419	-	+	-	+	BHV-5
SS5	-	+	-	+	BHV-5

Detección de BHV-5 en los bovinos inoculados experimentalmente. Fue posible determinar la infección con BHV-5 en cerebro y ganglio trigémino de los dos animales que presentaron cuadros clínicos más severos (16 y 18). Tanto la PCR-M, como el AV, resultaron positivos en cada caso. Las bandas observadas fueron correspondientes a BHV-5. El resto de las de muestras de órganos provenientes de estos animales, resultaron negativas por ambas técnicas.

3.7. Evaluación de la técnica en aislamientos de campo

Se analizaron varios aislamientos virales mediante IP y PCR-M. En todos los casos hubo total coincidencia entre los resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica y la PCR-M. En la tabla 3.10 se detallan los resultados obtenidos.

Tabla 3.11: **PCR-Multiplex en semen.** Diluciones máximas de virus y mezcla semen-virus que resultaron positivas mediante ECP/IFD y PCR-M.

Muestra	ECP/IFD	PCR-Multiplex	
		Fenol-Cloroformo	Chelex 100
Cultivo viral	10^{-6}	10^{-8}	10^{-7}
Semen fresco	10^{-2}	10^{-8}	10^{-7}
Semen pajuelas	10^{-5}	10^{-5}	10^{-8}

3.8. PCR-M a partir de semen

Se evaluó la utilidad de la PCR Multiplex en el diagnóstico de BHV en muestras de semen. Para ello a 9 volúmenes de semen de pajuelas, y a igual cantidad de semen fresco, se agregó un volumen del MaE de BHV-1 (pág. 34), conteniendo $2,8 \times 10^5$ UFP.

Por otro lado, se realizaron diluciones seriales 1:10 en MEM-E a partir del MaE de BHV-1. Luego se agregó un volumen de estas diluciones, a 9 volúmenes de semen de pajuelas o de semen crudo en cada caso.

Las diluciones del MaE correspondiente a BHV-1 y las mezclas semen-virus fueron sometidas al diagnóstico tradicional y por PCR-M. El material obtenido a partir del tratamiento con *Chelex 100* fue sometido a un segundo tratamiento con esta resina bajo las mismas condiciones.

En todos los casos el diagnóstico molecular fue positivo en diluciones mayores a lo detectado por la técnica clásica. En la tabla 3.11 se indican las últimas diluciones en las que se observaron resultados positivos, ya sea por aparición de efecto citopático característico de BHV (ECP), e IFD, como por visualización mediante electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación de la PCR-M.

3.9. Análisis estadísticos

Para realizar los análisis presentados en esta sección se utilizaron hisopados nasales obtenidos durante las experiencias controladas correspondientes a esta tesis y a un trabajo anterior [85].

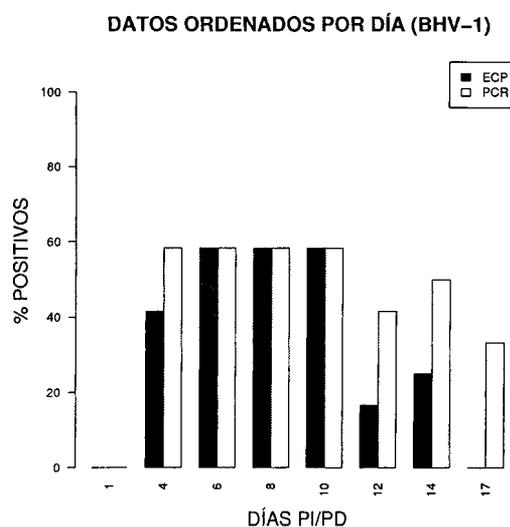


Figura 3.13: **Detección de BHV-1 por AV y PCR-M.** Porcentajes de muestras positivas según estas determinaciones en diferentes días post-inoculación (DPI) o post-desafío (DPD).

3.9.1. Análisis descriptivos

En base a los criterios utilizados para el análisis de los datos (ver apartado 2.4.1 en pág. 45), se calcularon los porcentajes (%) de resultados positivos obtenidos por ECP y por PCR-M para diferentes momentos de las experiencias de inoculación y/o desafío viral.

Muestras correspondientes a BHV-1. Como se observa en la Figura 3.13, en todos los casos donde se observaron muestras positivas por ECP, los porcentajes de muestras positivas por PCR-M fueron iguales o mayores. Puede observarse que la relación entre los porcentajes correspondientes a cada técnica fueron iguales durante los días 6, 8 y 10 PI/PD.

Muestras correspondientes a BHV-5. En el caso de las muestras correspondientes a la inoculación con BHV-5, durante 2 de los 15 días de la experiencia, los porcentajes de muestras positivas por ECP fueron mayores que los obtenidos por PCR-M (días 1 y 12 pi., Fig 3.14).

3.9.2. Análisis mediante remuestreo

Las muestras correspondientes a los *Dataset 1 y 2* (Tablas 2.6 y 2.7) fueron categorizadas en C (*concordancia entre ECP y PCR-M*) y D (*discordancia entre ECP y PCR-M*). Estos datos

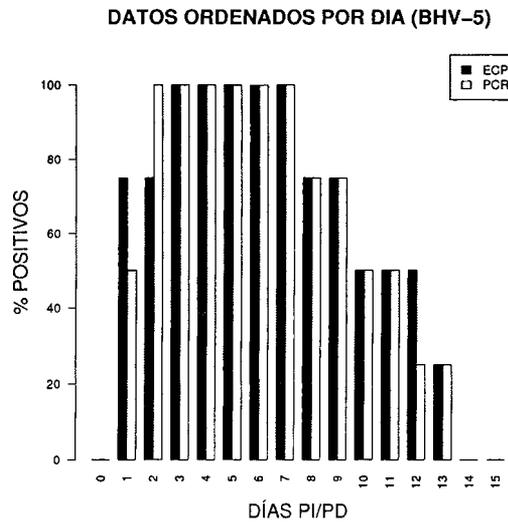


Figura 3.14: *Detección de BHV-5 por AV y PCR-M. Porcentajes de muestras positivas según estas determinaciones en diferentes días post-inoculación (DPI) o post-desafío (DPD).*

(Tablas 3.12, 3.13 y 3.14) fueron utilizados para la obtención de pseudomuestras (por remuestreos) mediante el uso de un programa diseñado para tal fin (Jones et al., datos no publicados) como se detalla a continuación.

A partir de estas Tablas se realizaron dos experimentos en los que se generaron series al azar. En el primero se realizaron remuestreos con reposición de cada día (1.000 remuestreos para el día 0, 1.000 para el día 1, etc.). En el segundo experimento, se realizaron remuestreos utilizando todas las columnas; es decir que cada pseudomuestra de largo 16 estuvo constituida por observaciones correspondientes a diferentes animales con diferentes tiempos de infección para cada animal. El primer test permite analizar el porcentaje de concordancia por día. El segundo constituye una simulación de lo que ocurriría en un laboratorio de diagnóstico (i.e. ingreso de muestras procedentes de animales con distinto tiempo de infección).

Los resultados de las simulaciones por día se resumen en la Tabla 3.15.

En el segundo experimento, los remuestreos completamente aleatorios indicaron concordancias de 87,21; 87,75 y 85,72 % cuando los datos utilizados fueron los correspondientes a las Tablas 3.12, 3.13 y 3.14, respectivamente.

		DPI/DPD						
		0	4	6	8	10	12	14
1	C	C	C	C	C	C	C	C
2	C	C	C	C	C	C	C	C
3	C	C	C	C	C	C	D	D
4	C	D	C	C	C	C	D	D
7	C	C	C	C	C	C	C	C
8	C	C	C	C	C	C	C	C
9	C	C	C	C	C	C	C	C
10	C	C	C	C	C	C	C	C
11	C	D	C	C	C	C	D	D
12	C	C	C	C	C	C	C	C
13	C	C	C	C	C	C	C	C
14	C	C	C	C	C	C	C	C
15	C	C	C	C	C	D	C	C
16	C	C	C	C	C	D	D	C
17	C	D	C	C	C	C	D	C
18	C	C	C	C	C	C	D	C

Tabla 3.12: **Análisis de la concordancia mediante remuestreo:** categorización de los datos correspondientes a BHV-1 y BHV-5, detallados en las Tablas 2.6 y 2.7 respectivamente.

		DPI/DPD							
		0	4	6	8	10	12	14	17
1	C	C	C	C	C	C	C	C	D
2	C	C	C	C	C	C	C	C	D
3	C	C	C	C	C	C	D	D	D
4	C	D	C	C	C	C	D	D	D
7	C	C	C	C	C	C	C	C	C
8	C	C	C	C	C	C	C	C	C
9	C	C	C	C	C	C	C	C	C
10	C	C	C	C	C	C	C	C	C
11	C	D	C	C	C	C	D	D	C
12	C	C	C	C	C	C	C	C	C
13	C	C	C	C	C	C	C	C	C
14	C	C	C	C	C	C	C	C	C

Tabla 3.13: **Análisis de la concordancia mediante remuestreo:** categorización de los datos correspondientes a BHV-1 detallados en la Tabla 2.6.

DPI	ANIMAL			
	15	16	17	18
0	C	C	C	C
1	D	C	C	C
2	C	C	D	C
3	C	C	C	C
4	C	C	C	C
5	C	C	C	C
6	C	C	C	C
7	C	C	C	C
8	C	C	C	C
9	C	C	C	C
10	D	D	C	C
11	D	D	C	C
12	C	D	D	D
13	C	C	C	C
14	C	C	C	C
15	C	C	C	C

Tabla 3.14: **Análisis de la concordancia mediante remuestreo:** categorización de las muestras de BHV-5, realizada a partir de los datos de la Tabla 2.7.

	DPI/DPD						
	0	4	6	8	10	12	14
BHV-1 y BHV-5 ^a	100	81.1	100	100	87.2	62.5	81.3
BHV-1 ^b	100	83.38	100	100	100	74.3	75
BHV-5 ^c	100	100	100	100	50	24.9	100

Tabla 3.15: **Remuestreos: porcentajes de concordancia por día.** Se indican los porcentajes de concordancia obtenidos a partir de 1000 remuestreos. a, b y c : datos calculados a partir de Tablas 3.12; 3.13 y 3.14, respectivamente.

		DPI/DPD							
		0	4	6	8	10	12	14	17
<i>a</i>	0	5	7	7	7	2	3	0	
<i>b</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>c</i>	0	2	0	0	0	3	3	4	
<i>d</i>	12	5	5	5	5	7	6	8	
<i>k</i>	1	0,676	1	1	1	0,437	0,636	0,5	
L_i	–	0,288	1	1	1	–0,018	0,208	0,076	
L_s	–	1	1	1	1	0,893	1	0,924	

Tabla 3.16: *Indices kappa para BHV-1 por día.*

		DPI															
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>a</i>	0	2	3	4	4	4	4	4	3	3	1	0	0	1	0	0	
<i>b</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	0	0	0	
<i>c</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	
<i>d</i>	4	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	2	1	3	4	4	
<i>k</i>	1	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	–0,5	1	1	1	
L_i	–	–0,235	1	–	–	–	–	–	1	1	–0,98	0	–1	1	–	–	
L_s	–	1	1	–	–	–	–	–	1	1	0,98	0	0,235	1	–	–	

Tabla 3.17: *Indices kappa para BHV-5 por día.*

3.9.3. Análisis no paramétricos

Aplicación del índice *kappa*. El test «kappa» fue aplicado a los datos agrupados por día. El índice *k* fue calculado, además, a partir de ambos *Datasets* agrupados. En la Tablas 3.16, 3.17, y 3.18 se muestran los resultados obtenidos y los L_s y L_i (α 0,05).

3.9.4. Análisis de agrupamiento

Si cada día se toma como una unidad taxonómica y cada animal como un carácter con dos estados (Concordancia, Discordancia), es posible estimar el grado de similitud entre los días mediante un análisis de la similitud global³

En la Figura 3.15 se observa que, al aplicar este tipo de análisis, los días quedan agrupados de manera congruente con lo observado mediante el análisis descriptivo, los análisis del índice

³En la sección 2.4.3 de la página 48 se describe el método en forma más detallada.

	DPI/DPD						
	0	4	6	8	10	12	14
<i>a</i>	0	9	11	10	8	2	3
<i>b</i>	0	0	0	0	1	2	0
<i>c</i>	0	2	0	0	1	4	3
<i>d</i>	16	5	5	6	6	8	10
<i>k</i>	1	0,738	1	1	0,746	0,143	0,143
<i>L_i</i>	-	0,41	1	1	0,417	-0,338	-0,338
<i>L_s</i>	-	1	1	1	1	0,624	0,624

Tabla 3.18: **Indices kappa para BHV-1 y BHV-5 por día.**

kappa y los estudios mediante remuestreo. Es decir que los días iniciales y finales del ciclo de infección (cuatro, doce, catorce) se agrupan juntos y, separadamente, se obtiene un cluster para los días centrales del ciclo (6, 8, 10).

En el día cero, lógicamente, se observa una concordancia absoluta. Dado que el día cero se agrupa con los días correspondientes a etapas centrales del ciclo infectivo, es posible suponer que la separación de estos días con respecto a las etapas tempranas y tardías se debe a una disminución de la concordancia en estos últimos.

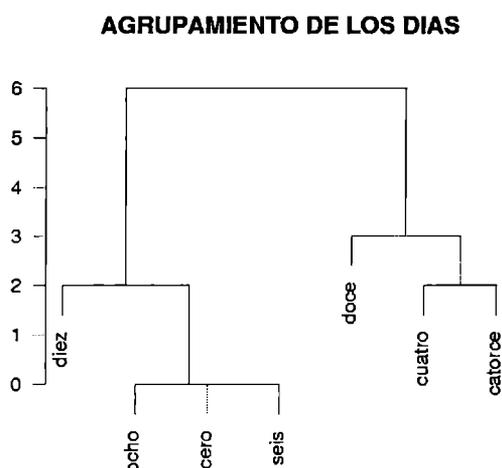


Figura 3.15: **Análisis estadísticos: componente temporal en el diagnóstico. Análisis por similitud.**

Capítulo 4

Discusión y conclusiones

BHV-1 y BHV-5 ocasionan patologías diferentes. Las inoculaciones experimentales realizadas en bovinos, además de permitir la obtención de muestras para el desarrollo de la PCR-M, permitieron reproducir claramente la enfermedad clínica. La respuesta serológica y las curvas de excreción viral de los animales inoculados demostraron una activa multiplicación y eliminación de virus. Todos los animales utilizados como centinelas¹ secretaron altas cantidades de virus (ver páginas 52 y 54).

Los cuadros clínicos fueron marcadamente diferentes en ambas experiencias, demostrando que BHV-1 y BHV-5 constituyen entidades diferentes desde el punto de vista clínico.

En el caso de BHV-5, fue característica en nuestra experiencia la gravedad con la que se presentaron los síntomas nerviosos, siendo marcadamente severos en dos de los animales, los cuales murieron al finalizar la segunda semana.

Es importante destacar que hasta el momento de nuestra experiencia, no se había publicado ningún trabajo donde se hubiera reproducido fielmente la sintomatología nerviosa bajo estas condiciones (animales mayores de 5 meses, inoculados por vía intranasal y sin la administración de depresores del sistema inmune²). En los estudios previos no se pudo observar sintomatología [37, 42], o bien esta apareció en animales recién nacidos y descalostrados [92], o sólo mediante

¹ Animales que estuvieron en contacto con los animales inoculados; es decir que se contagiaron en forma natural.

² Es decir que la inoculación se realizó de una manera muy aproximada a la forma en que la infección podría proceder en la naturaleza.

inoculaciones por vía intracerebral [93] o epidural [94] (i.e. parenteral, es decir no por la vía natural). En dos trabajos recientemente publicados [28, 95] se obtuvieron resultados similares a los aquí reportados; sin embargo, dichos autores no lograron aislar virus de ningún tejido de los animales inoculados. En nuestro caso fue posible recuperar virus de las muestras de cerebro y de ganglio trigémino. La evidencia presentada hasta el momento, por lo tanto, no permitía demostrar completamente la diferencia entre los procesos patogénicos asociados con BHV-1 y BHV-5.

En síntesis, existían controversias acerca de la neurovirulencia de este patógeno: por un lado se había demostrado la neuroinvasividad de BHV-5, pero por el otro, no se había podido corroborar su patogenicidad en todos los casos de inoculaciones experimentales [42]. Por lo tanto, las experiencias controladas realizadas en esta tesis constituyeron un aporte a la comprensión de la patogénesis asociada con los virus herpes, ya que permitieron probar que BHV-1 y BHV-5 constituyen dos entidades distintas desde el punto de vista de los procesos patogénicos observados en el bovino.

Es importante contar con un sistema de producción viral. El material obtenido de las inoculaciones experimentales fue utilizado para evaluar el desempeño de la PCR-M. Estos especímenes clínicos representaron muestras control muy importantes para evaluar la técnica con antelación a su estudio en muestras de campo: las muestras obtenidas mediante inoculaciones experimentales se asemejan mucho más a una muestra tomada a campo que un espécimen obtenido por pasaje del virus en células. En el presente estudio se demuestra que es posible producir controles de alta calidad de manera relativamente sencilla si se cuenta con las instalaciones y los protocolos adecuados. El suministro de controles es una de las tareas que debe cubrir un laboratorio de referencia.

Luego de sucesivos pasajes a través de cultivos celulares, se produce un fenómeno de adaptación del virus a los mismos y, consecuentemente, una disminución o pérdida de sus características naturales (como la patogenicidad y el *fitness* en el huésped natural). Cuando se realizan estudios de índole médica (e.g. patogénesis viral, respuesta inmune) es altamente deseable contar con el

patógeno en estado natural.

Por lo tanto, la posibilidad de producir material viral a partir de animales puede resultar de importancia para comprender la biología del agente, ya que permitiría contar con inóculo patogénico y con un *fitness* alto en el huésped natural.

Las resinas de intercambio iónico constituyen una buena alternativa frente a los solventes orgánicos. Las experiencias realizadas con la resina *Chelex 100* (apartados 3.6, 3.7 y 3.8) mostraron que este tipo de tratamiento puede ser implementado con relativa sencillez en la rutina de diagnóstico.

La utilización de *Chelex 100* presenta varias ventajas con respecto a la extracción orgánica, ya que en el caso de la extracción con fenol/cloroformo se realizan separaciones de fases que involucran varios pasos, mientras que en el tratamiento con *Chelex 100* toda la reacción ocurre en un mismo tubo y en un solo paso, lo cual reduce las posibilidades de contaminación de la muestra y de pérdida de DNA. Además se evita el uso de material tóxico para el operador y, principalmente, se reduce considerablemente el tiempo necesario para la obtención del molde de DNA. Por otro lado, la cantidad de muestra requerida es aproximadamente 10 veces menor a la requerida en la extracción tradicional.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se puede recomendar el uso de resinas de intercambio iónico en laboratorios de diagnóstico, lo cual redundaría en una disminución de costos, riesgos y tiempo de manipulación. Cabe destacar que la manipulación de las muestras ha demostrado ser uno de los pasos críticos en cuanto a la posibilidad de que se produzcan contaminaciones cruzadas [96]. Por lo tanto, además de las ventajas mencionadas arriba, es posible que el uso de *Chelex 100* u otra resina resulte en un aumento de la confiabilidad del diagnóstico en cuanto a la posibilidad de ocurrencia de falsos positivos.

La combinación de *primers* más adecuada es TK-1/TK-2/GD-1/GD-2. Los dos pares de *primers* que resultaron adecuados, en cuanto a la producción repetible y con buen rendimiento, para la PCR dirigida específicamente contra BHV-5 fueron GC-1/GC-2 y GD-1/GD-2 (apartado 3.4.1). Estos permitieron obtener amplicones de un tamaño diferente al producido utilizando los

primers TK-1/TK-2, que amplifican exclusivamente una región del genoma de BHV-1 ³

Si bien mediante electroforesis en geles de agarosa es posible diferenciar los amplicones obtenidos utilizando el par de oligonucleótidos TK-1/TK-2 de los obtenidos mediante el par GC-1/GC-2, es necesario cierto adiestramiento para lograrlo (e.g. conocer el tiempo de corrida) debido a que la diferencia de tamaño no es muy marcada. Por lo tanto se concluyó que la combinación más adecuada si se desea implementar la técnica en laboratorios de diagnóstico es TK-1/TK-2/GD-1/GD-2.

La sensibilidad de la PCR-M es similar a la del AV. La sensibilidad de la técnica presentada en esta tesis para la detección de BHV-1 fue mayor que la observada para el aislamiento en cultivo de tejidos (AV). El efecto citopático (ECP) fue evidente hasta la sexta dilución, mientras que mediante la PCR-M se observaron bandas en diluciones mayores⁴ (apartado 3.5).

En el caso de BHV-5, el AV viral fue positivo en una dilución mayor a la PCR-M cuando el DNA utilizado como molde fue obtenido mediante la extracción con solventes orgánicos. Sin embargo, cuando se utilizó *Chelex 100* la sensibilidad observada para el aislamiento viral y la PCR-M fueron iguales (Tabla 3.6, pág. 65).

Las estimaciones realizadas en base a estos resultados indican en ambos casos que la técnica tiene una capacidad de detección que ronda las 10 UFP/ml. Las técnicas de PCR utilizadas con fines diagnósticos para otros agentes poseen niveles de detección cercanos a los aquí indicados [79]. Por lo tanto, se puede concluir que la PCR-M descrita en este trabajo tiene una sensibilidad adecuada para ser utilizada como herramienta diagnóstica.

La PCR-M es, simultáneamente, diagnóstica y diferencial. Con respecto a la especificidad (apartado 3.5.1), se observó que la técnica no produce amplicones detectables en geles de agarosa/bromuro de etidio cuando se utilizan los agentes detallados en la Tabla 2.4 (pág. 36).

Estos análisis soportan la utilización de la PCR-M presentada en este trabajo como her-

³El producto de amplificación correspondiente al par TK-1/TK-2 es de 183 pb, mientras que los correspondientes a los pares GC-1/GC-2 y GD-1/GD-2 son de 153 y 563 pb, respectivamente.

⁴En una dilución mayor con la extracción de fenol/cloroformo y en dos diluciones más con el tratamiento con *Chelex 100*.

ramienta diagnóstica de BHV-1 y BHV-5 (i. e. permite discriminar BHV-1 y BHV-5 de otros agentes). Por otro lado, la técnica también permitió diferenciar BHV-1 de BHV-5 en el 100 % de los ensayos realizados.

Se puede decir, entonces, que el método permite realizar simultáneamente dos tipos de clasificación de las muestras: i) diferenciación de BHV-1 y BHV-5 de otros agentes, ii) diferenciación entre BHV-1 y BHV-5.

La PCR-M presentó un comportamiento adecuado en diferentes tipos de muestra. La utilidad de la PCR-M como herramienta diagnóstica en diferentes especímenes (hisopados nasales, órganos y muestras de semen) fue evaluada mediante la comparación de ésta con los métodos de AV e IP (secciones 3.6 y 3.8).

Los estudios realizados en esta tesis fueron alentadores al respecto (sección 3.6). Cuando el método se aplicó a hisopados nasales, hubo una correspondencia del 100 % entre la PCR-M y AV para BHV-1. En el caso de BHV-5, se pudo determinar que en todos los casos en los cuales la PCR-M resultó negativa y el AV positivo, el título viral fue inferior a $10^{1,5} DICT_{50} \%/ml^5$ (siendo entonces la diferencia de detección entre ambas técnicas menor o igual a un logaritmo). Estos resultados son congruentes con las determinaciones de sensibilidad realizadas a partir de suspensiones virales obtenidas a partir de células *in vitro*. Los hisopados nasales son las muestras que se envían más comunmente para AV en los casos de sospecha de la presencia de BHV en los rodeos. Los resultados obtenidos permiten inferir que la PCR-M puede ser utilizada para el diagnóstico de BHV-1 y BHV-5 a partir de este tipo de muestras.

Cuando se analizaron por AV/IP y PCR-M las muestras de órganos⁶ se observó que todas las muestras que fueron positivas por AV/IP, también lo fueron por PCR-M tanto para BHV-1 como para BHV-5 (apartado 3.6.2). Por lo tanto es posible realizar la detección de DNA partiendo directamente de homogenatos, evitando el uso de cultivos celulares para los cuales los tejidos pueden contener elementos que resultan tóxicos para los cultivos celulares.

⁵Este título corresponde con la aparición de efecto citopático en la primer dilución (1/10) de una suspensión viral.

⁶Las muestras analizadas fueron 21 cerebros y 11 muestras de diferentes órganos obtenidas durante la inoculación experimental de BHV-5.

La componente temporal en el análisis virológico. Es un hecho conocido que los procesos patogénico-fisiológicos experimentan variaciones a lo largo de una infección. La disponibilidad de un agente viral en la sangre, en las secreciones o en diferentes órganos, no es la misma a lo largo del ciclo infeccioso. Estas variaciones deberían, por deducción, afectar el desempeño de los métodos de detección del patógeno asociado. Sin embargo, el efecto de la variación propia del proceso infeccioso sobre los métodos diagnósticos no ha sido estudiada en un marco estadístico. Por esta razón, en el presente trabajo se implementó un diseño experimental (apartado 3.9, pág. 70) destinado a estudiar este problema.

Tanto en el caso de los análisis mediante el estadístico *kappa* como en los estudios utilizando remuestreo, se observó que existe una alta concordancia durante los días centrales del ciclo de infección viral. Por el contrario, se observaron concordancias relativamente bajas durante los primeros y últimos días.

Es posible que las diferencias en el comportamiento de las técnicas a lo largo de una infección no se deban exclusivamente a la cantidad de partículas virales presentes en cada caso. En este trabajo se utilizaron muestras de hisopados nasales obtenidas bajo condiciones controladas. El desarrollo de las inoculaciones experimentales no sólo permitieron estimar la curva de excreción viral, sino también establecer las variaciones ocurridas en diferentes parámetros clínicos evaluados (inflamación, fiebre, presencia o ausencia de secreciones y características de las mismas, respuesta inmune humoral). De acuerdo a las observaciones realizadas fue posible considerar que los componentes presentes en los hisopados no fueron los mismos en cada momento de las experiencias, siendo posible que algunos de ellos, pudiera influenciar en el desempeño de los métodos de detección viral.

Es posible, entonces, que las variaciones temporales que ocurren durante el ciclo de infección afecten la capacidad diagnóstica de diferentes métodos. Estas observaciones podrían ser aún más marcadas en el caso de muestras provenientes de casos clínicos, donde las condiciones de infección, toma de muestra y transporte de la misma, estado inmune, etc., pueden variar de un caso a otro.

Por lo tanto, los métodos descriptos en el apartado 3.9 podrían servir como modelo para

evaluar el desempeño de metodologías diagnósticas utilizando muestras obtenidas mediante inoculaciones controladas, donde es posible obtener más información de los diferentes aspectos involucrados en el proceso infeccioso que la que posiblemente ofrecen los protocolos que normalmente acompañan a las muestras clínicas que son enviadas a los laboratorios de diagnóstico.

La PCR presenta algunas ventajas con respecto al AV. El diagnóstico por aislamiento viral requiere de un adecuado acondicionamiento y envío de las muestras. En nuestro medio, debido a las distancias entre el campo y los laboratorios, puede resultar difícil lograr el correcto mantenimiento de las mismas. El uso de PCR, por ser una técnica de detección molecular, aporta la ventaja de no requerir que el virus permanezca viable.

La aplicación de PCR en muestras de órganos puede ser utilizada no sólo con fines diagnósticos, sino también como herramienta para el estudio de las diferentes etiologías relacionadas con los herpesvirus. Por ejemplo, esta técnica ha sido utilizada en varias inoculaciones experimentales [42, 28, 97, 98, 99, 100] y ha permitido conocer los lugares de establecimiento del virus durante el período de latencia⁷, ya que en este estado resulta imposible la detección de virus mediante el AV.

Hubo total coincidencia cuando 20 aislamientos de campo fueron analizados mediante inmunoperoxidasa con anticuerpos monoclonales y por PCR-M (apartado 3.7). De esta manera se demostró que la técnica puede aplicarse a aislamientos de diferentes orígenes, obtenidos a partir de diferentes casos clínicos producidos por los dos tipos virales. Esto es un indicio de la capacidad que tiene la PCR-M para detectar los casos de infección por estos herpesvirus, que podrían provenir de diferentes regiones del país. Sería interesante analizar aislamientos de otras partes del mundo con el fin de establecer la posibilidad de que la técnica pueda ser utilizada internacionalmente.

Algunos tipos de muestra pueden presentar dificultades cuando se utilizan métodos moleculares. En relación a los efectos tóxicos y/o inhibitorios que las muestras clínicas pueden

⁷En los estudios controlados estos corresponden a los períodos entre la finalización del cuadro agudo y la aplicación de inmunodepresores para provocar la reactivación del virus.

tener para la PCR, el semen resulta la muestra más problemática debido a la naturaleza de sus componentes. Existen también otros factores que pueden afectar la infectividad del virus en el semen. Por ejemplo, el virus puede ser neutralizado por los anticuerpos⁸. La relación entre la cantidad de genomas o partículas físicas y de virus infectivo es de 30 a 100 [101, 102, 103]. El material que se destina a la comercialización es sometido a un tratamiento en el cual se le agregan diluyentes y crioprotectores que pueden actuar como inhibidores de la PCR y además, producen un efecto dilutorio en las muestras. Es por esto que la evaluación del uso de la PCR-M en este tipo de especímenes fue considerado en un apartado diferente a las determinaciones en otro tipo de muestras.

Las muestras de semen naturalmente infectadas con BHV-1 generalmente contienen muy pocas cantidades de virus. La presencia de virus en el semen se debe a reactivaciones periódicas del agente en el animal. Esto hace que el material comercializado deba ser analizado previamente, con el fin de desechar aquel que pudiera resultar infectante para los animales receptores. Cuando se utilizan técnicas tradicionales se requieren al menos 21 días para determinar que una muestra es negativa⁹. Por el contrario, la utilización de las técnicas de PCR permiten establecer si una muestra es positiva en un día.

Los resultados obtenidos mediante la comparación entre la detección de virus presente en una serie de diluciones y las mezclas de semen-virus demostraron que la técnica de PCR-M puede resultar más sensible que el diagnóstico tradicional (sección 3.8). Si bien las reglamentaciones internacionales exigen el uso de los métodos virológicos clásicos, la técnica de PCR podría ser incorporada en la rutina de diagnóstico, tal como lo sugiere el manual de procedimientos estándares para tests diagnósticos de la OIE [32].

Ventajas respecto a otras pruebas moleculares similares. La PCR es una técnica basada en la detección de ácidos nucleicos y ha sido ampliamente difundida como herramienta diagnóstica en los últimos años. Esto se debe principalmente al hecho de que resulta más rápida, menos

⁸Como se mencionó en el apartado 1.4.4, la aparición de los anticuerpos neutralizantes coincide con la disminución del virus en las secreciones.

⁹El método de diagnóstico clásico consiste en la realización de tres pasajes ciegos de siete días de duración y de una técnica de detección inmunológica [32].

laboriosa y más económica que los métodos de diagnóstico tradicionales como el aislamiento viral y la inmunofluorescencia. Además presenta la ventaja de que permite detectar tanto virus activados como inactivados.

Hasta el momento, se habían diseñado dos técnicas de PCR diferenciales entre BHV-1 y BHV-5 [42, 104], pero en ambos casos la diferenciación se logra mediante estrategias de *nested* PCR. En los dos trabajos se utilizaron tres rondas de amplificación para llegar al diagnóstico final. Si bien mediante el uso de una *nested* PCR sería posible aumentar la sensibilidad de la técnica, también es cierto que se exacerban las posibilidades de contaminación cruzada [45]. Esto representa una importante limitación en el uso de esta técnica como herramienta de rutina en los laboratorios.

En otro trabajo [41] se describe una técnica diagnóstica potencialmente diferencial. Esta se basa en la amplificación de una porción del gen de la *Timidina Kinasa*. Dado que BHV-1 y BHV-5 presentan diferencias en el largo de dicha secuencia, sería posible diferenciar estos agentes mediante el análisis del tamaño de los amplicones. Sin embargo, cabe destacar que la diferencia entre dichos fragmentos de amplificación es solamente de 25 pb, lo cual pone en duda la posibilidad de su implementación en laboratorios de diagnóstico.

Debido a que en la actualidad no existe en el mercado ningún test serológico capaz de diferenciar entre las infecciones producidas por BHV-1 o BHV-5, la PCR-M presentada en esta tesis podría servir como una herramienta para realizar estudios con fines epidemiológicos.

Bibliografía

- [1] Davison A, Eberle R, Desrosiers R, Fleckentein B, Mc Geoch D, Pellet P, et al. Family Herpesviridae. on Taxonomy on Viruses Data Base (ICTVdb)(ed) EIC, editor. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>. New York-London: Plenum press; 2002.
- [2] French E. Relationship between infectious rhinotracheitis (IBR) virus and virus isolated from calves with encephalitis. *Australian Veterinary Journal*. 1962;38:555–556.
- [3] Ludwig H. Bovine Herpesvirus. En: Roizman Be, editor. New York-London: Plenum press; 1983.
- [4] Misra V, Babiuk T, Le Q, Darcel C. Analysis of bovine herpesvirus type 1 isolates by restriction endonuclease fingerprinting. *Archives of Virology*. 1983;76:341–354.
- [5] Engels M, Steck F, Wyler R. Comparison of the genomes of Infectious Bovine Rhinotracheitis and Pustular Vulvovaginitis Virus Strains by Restriction Endonuclease Analysis. *Archives of Virology*. 1981;67:169–174.
- [6] Metzler A, Matile H, Gassmann U, Engels M, Wyler R. European isolates of bovine herpesvirus 1: A comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Archives of Virology*. 1985;85:57–69.
- [7] Schudel A, Carrillo B, R W, Metzler A. Infections of Calves with Antigenic Variants of Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) and Neurological Disease. *Journal of Veterinary Medicine B*. 1986;33:303–310.

-
- [8] Metzler A, Schudel A, Engels M. Bovine Herpesvirus 1: Molecular and Antigenic Characteristics of Variant Viruses Isolated from Calves with Neurological Disease. *Archives of Virology*. 1986;87:205–217.
- [9] Seal B, St Jeor S, Lee Taylor R. Restriction Endonuclease Analysis of Bovine Herpesvirus 1 DNA and Nucleic Acid Homology between Isolates. *Journal of General Virology*. 1985;66:2787–2792.
- [10] Brake F, Studdert M. Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesviruses including bovine, buffalo and caprine herpesvirus 1 and bovine encephalitis herpesvirus. *Australian Veterinary Journal*. 1985;62:331–334.
- [11] Engels M, Giuliani C, Wild P, Beck T, Loepfe E, Wyler R. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Research*. 1986;87:57–73.
- [12] Bulach D, Studdert M. Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1 and buffalo herpesvirus. *Archives of Virology*. 1990;113:17–34.
- [13] Bratanich A, Sardi S, Smitsaart E, Schudel A. Comparative Studies of BHV-1 Variants by In Vivo-In Vitro Tests. *Journal of Veterinary Medicine B*. 1991;38:41–48.
- [14] Murphy F. The family Herpesviridae: an update. *Archives of Virology*. 1992;123:425–449.
- [15] French E. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. *Australian Veterinary Journal*. 1962;38:216–221.
- [16] Johnston L, Simmons G, McGavin M. A viral meningo-encephalitis in calves. *Australian Veterinary Journal*. 1962;38:207–215.
- [17] Barenfus M, Delli Quadri C, McIntyre R, Schroeder R. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from calves with meningoencephalitis. *J Am Vet Med Assoc*. 1963;143:725–728.

- [18] d'Offay J, Mock R, Fulton R. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. *American Journal Veterinary Research*. 1993;54:534-539.
- [19] Carrillo B, Ambrogí A, Schudel A, Vázquez M, Dahme E, Pospischil A. Meningoencephalitis caused by IBR Virus in Calves in Argentina. *Journal of Veterinary Medicine B*. 1983;30:327-332.
- [20] Bartha A, Hajdu G, Aldasi P, Paczolay G. Occurrence of encephalitis caused by infectious bovine rhinotracheitis virus in calves in Hungary. *Acta Vet Hung*. 1969;19:2145-2151.
- [21] Gough A, James D. Isolation of IBR virus from heifer with meningoencephalitis in calves. *Can Vet J*. 1975;16:313-314.
- [22] Roehe P, Silva T, Nardi N, Oliveira D, Almeida Rosa J. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e o herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesq Vet Bras*. 1997;17:41-44.
- [23] Moretti B, Orfei Z, Mondino G, Perschino A. Infectious bovine rhinotracheitis clinical observation of virus. *Vet Italiana*. 1964;15:676.
- [24] Wentink G, van Oirschot J, Verhoeff J. Risk of infection with bovine herpes virus 1 (BHV-1): a review. *Veterinary Quarterly*. 1993;15:30-33.
- [25] Blood D, Radostitis O. Enfermedades causadas por virus y clamidias (II). Enfermedades víricas caracterizadas por síntomas respiratorios. En: Blood D, (eds) RO, editors. Nueva editorial panamericana and Col. Atampla and México; 1992.
- [26] Gibbs E, Rweyemamu M. Bovine herpesviruses. Part 1. *The veterinary bulletin*. 1977;47:317-329.
- [27] Tikoo S, Campos M, Babiuk L. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): Biology and Pathogenesis and Control. *Advances in Virus Research*. 1995;45:191-223.

- [28] Meyer G, Lemaire M, Ros C, Belák K, Gabriel A, Cassart D, et al. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Archives of Virology*. 2001;146:633–652.
- [29] Fediasky A. A reference guide for animal health staff. Food, of the United Nations Secretariat of the Pacific Community AO, editors. FDA and USA; 2004.
- [30] Graat E, de Jong M, Frankena K, Franken P. Modelling the effect of surveillance programmes on spread of bovine herpesvirus 1 between certified cattle herds. *Veterinary Microbiology*. 2001;79:193–208.
- [31] Van Oirschot J. The BHV-1 Situation in Europe. de Santa María (ed) EUF, editor. Universidad Federal de Santa María and Brasil; 1998.
- [32] Van Oirschot J. Infectious Bovine Rhinotracheitis / Infectious Pustular Vulvovaginitis. (ed) EOOSC, editor. OIE. Paris and Francia.; 2000.
- [33] Rodríguez M, Suárez Heinlein B, Ruiz M, Metzler A, Schudel A. Detection of bovine herpesvirus type 1 via an immunoperoxidase method and using monoclonal antibodies. *American Journal of Veterinary Research*. 1989;50:619–621.
- [34] Giavedoni L, Ruiz M, Fijtman N, Schudel A, Rodríguez M. Rapid Diagnosis of Bovine Herpesvirus Encephalitis: Comparison of Nucleic Acid Hybridization and Immunoperoxidase Methods using Clinical Samples. *Journal of Veterinary Medicine B*. 1988;35:280–285.
- [35] Bratanich A, Sardi S, Smitsaart E, Estévez Madero J, Schudel A. Comparison of three serological techniques for the diagnosis of bovine herpesvirus type 1: serum neutralization and enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence. *Revista Argentina de Microbiología*. 1990;22:192–198.
- [36] González E, Oliva G, Etcheverrigaray M, Schudel A, Nosetto E. Aplicación de las técnicas de hemoaglutinación pasiva (HAP) e inmunofluorescencia indirecta en el diagnóstico de rinotraqueítis infecciosa bovina. *Revista de Medicina Veterinaria*. 1985;66:26–30.

- [37] Cascio K, Belknap E, Schultheiss P, Ames A, Collins J. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1999;11:134–139.
- [38] Belák S, Ballagi-Pordány A. Application of the Polymerase Chain Reaction (PCR) in Veterinary Diagnostic Virology. *Veterinary Research Communications*. 1993;17:55–72.
- [39] Kibenge F, Harris L, McKenna P, Wadowska D, Yason C. Amplification of strains of bovine herpesvirus 1 by use of polymerase chain reaction with primers in the thymidine kinase region. *American Journal of Veterinary Research*. 1994;55:1206–1212.
- [40] Vilcek S. Detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) genome by PCR. *Journal of Virological Methods*. 1993;41:245–248.
- [41] Moore S, Gunn M, Walls D. A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. *Veterinary Microbiology*. 2000;75:145–153.
- [42] Ashbaugh S, Thompson K, Belknap E, Schulteiss P, Choudhury S, Collins J. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1997;9:387–394.
- [43] Roizman B, Knippe D. Herpes Simplex Viruses and Their Replication. En: Knippe D, Howley P, editors. Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Estados Unidos; 2001.
- [44] Delhon G, Morales M, Lu Z, Alfonso C, Flores E, Weiblen R, et al. Genome of Bovine Herpesvirus 5. *Journal of Virology*. 2003;77:10339–10347.
- [45] Berría M. Familia Herpetoviridae. En: Carballal G, J O, editors. El Ateneo and Buenos Aires; 1998.
- [46] Li Y, Van Drunen Little-van den Hurk S, Babiuk L, Ling X. Characterization of Cell-Binding Properties of Bovine Herpesvirus 1 Glycoproteins B and C and D: Identification of a Dual Cell-Binding Function of gB. *Journal of Virology*. 1995;69:4758–4768.

-
- [47] Liang X, Babiuk L, Zamb T. Mapping of heparin-binding structures on bovine herpesvirus 1 and pseudorabies virus gIII glycoproteins. *J Virol.* 1993;194:233–243.
- [48] Liang X, Babiuk L, Van Drunen Little-van den Hurk S, Fitzpatrick D, Zamb T. Bovine Herpesvirus 1 Attachment to Permissive Cells is Mediated by Its Major Glycoproteins gI and gIII and gIV. *Journal of Virology.* 1991;65:1124–1132.
- [49] Wild P, Schraner E, Peter J, Loepfe E, Engels M. Novel Entry Pathway of Bovine Herpesvirus 1 and 5. *Journal of Virology.* 1998;72:9561–9566.
- [50] Sodeik B, Ebersold W, Helenius A. Microtubule-mediated Transport of Incoming Herpes Simplex Virus 1 Capsids to the Nucleus. *The Journal of Cell Biology.* 1997;136:1007–1021.
- [51] Winkler M, Doster A, Jones C. Persistence and Reactivation of Bovine Herpesvirus 1 in the tonsils of Latently Infected Calves. *Journal of Virology.* 2000;74:5337–5346.
- [52] Jones C, Delhon D, Bratanich A, Kutish G, Rock D. Analysis of the Transcriptional Promoter Which Regulates the Latency-Related Transcript of Bovine Herpesvirus 1. *Journal of Virology.* 1990;64:1164–1170.
- [53] Bratanich A, 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. *Journal of Virology.* 1992;66:6099–6106.
- [54] Kutish G, Mainprize T, Rock D. Characterization of the Latency-Related Transcriptionally Active Region of the Bovine Herpesvirus 1 Genome. *Journal of Virology.* 1990;64:5730–5737.
- [55] Van Oirschot J. Bovine herpesvirus 1 en semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *Vet Quarterly.* 1995;17:29–33.
- [56] Babiuk L, Van Drunen Littel-van den Hurk S, Tikoo S. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Veterinary Microbiology.* 1996;53:31–42.

- [57] Campos M, Bielefeldt Ohmann H, Hutchings D, Rapin N, Babiuk L. Cytokine applications in infectious diseases. B EG, I M, editors. CRC Press and Boca Ratón; 1994.
- [58] Fainboim L, Satz M. Presentación Antigénica y Activación Linfocitaria. En: Fainboim L, Satz M, editors. Fainboim L and Buenos Aires; 1992.
- [59] Babiuk L, L'italien J, Van Drunen Littel-van den Hurk S, Zamb T, Lawman M, Hughes G, et al. Protection of cattle from Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) infection by immunization with individual glycoproteins. *Virology*. 1987;159:57-66.
- [60] Hughes G, Babiuk L, Van Drunen Littel-van den Hurk S. Functional and topographical analyses of epitopes on Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein IV. *Archives of Virology*. 1988;103:47-62.
- [61] Van Drunen Littel-van den Hurk S, Van Den Hurk J, Babiuk L. Topographical analysis of Bovine herpesvirus 1 glycoproteins: use of monoclonal antibodies to identify and characterize functional epitopes. *Virology*. 1985;144:216-227.
- [62] Fitzpatrick D, Redmond M, Attah-Poku S, Van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk L. Mapping of ten epitopes on bovine herpesvirus type 1 glycoproteins gI and gIII. *Virology*. 1990;176:145-157.
- [63] Pritchard G, Banks M, Vernon R. Subclinical breakdown with infectious bovine rhinotracheitis virus infection in dairy herd of high health status. *The Veterinary Record*. 2003;153:113-117.
- [64] Wiseman A, Selman I, Misolla P, Pirie H, Allan E. The financial burden of infectious bovine rhinotracheitis. *The Veterinary Record*. 1979;105:469.
- [65] Hage J, Schukken Y, Dijkstra T, Barkema H, van Valkengoed P, Wentink G. Milk production and reproduction during a subclinical bovine herpesvirus 1 infection on a dairy farm. *Preventive Veterinary Medicine*. 1998;34:97-106.

- [66] Castrucci G, Martin M, Frigeri F, Ferrari M, Salvatori D, Tagliati S, et al. A Serological Survey of Bovine Herpesvirus-1 Infection in Selected Dairy Herds in Northern and Central Italy. *Comp Immun Microbiol.* 1997;20:315–317.
- [67] Madin S. Isolation of the Infection Bovine Rhinotracheitis Virus. *Science.* 1956;124:721–722.
- [68] Pituco E, Del Fava C. Situacao do BHV-1 na América Do Sul. y Virus de la Diarrea Viral Bovina RSIHB, editor. Universidad Federal de Santa María, Brasil; 1998.
- [69] Mezzadra H, Pauli R. Rinotraqueítis bovina infecciosa (IBR). Antecedentes en la República Argentina. *FAVE.* 1982;2:157–162.
- [70] Lager I, Fondevila N, Sadir A, Fernández F, Schudel A. Rinotraqueítis infecciosa bovina (HVB-1) I: Aislamiento y caracterización biológica del agente etiológico (L-114). *Revista Medicina Veterinaria.* 1981;62:404–410.
- [71] Schudel A, González T, Etcheverrigaray M. Rinotraqueítis Infecciosa Bovina: detección de anticuerpos en bovinos de la Provincia de Buenos Aires. II Congreso Argentino de Microbiología. 1979;25.
- [72] Fondevila N, Lager I, Sadir A, Carrillo B, Villar J, Venzano A, et al. Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (HVB-1) III: prevalencia de anticuerpos en rodeos bovinos del país. *Revista de Investigaciones Agropecuarias INTA.* 1981;16:285–289.
- [73] Carrillo B, Pospischil A, Dahme E. Pathology of a Bovine Viral Necrotizing Encephalitis in Argentina. *Journal of Veterinary Medicine B.* 1983;30:161–168.
- [74] Carrillo B, Bardón J, Combesies G, Nosedá R, Delhon G, Rodríguez M, et al. Diagnóstico de neuropatologías en bovinos del área pampeana: observaciones de casuística. *Revista de Medicina Veterinaria.* 1993;74:282–287.

- [75] Suarez Heinlein A, Metzler A, Weiblen R, Berrios P, Schudel A, Rodriguez M. Molecular Characterization of South American Bovine Herpesvirus-1 Isolates with Monoclonal Antibodies and SDS-PAGE. *Journal of Veterinary Medicine B*. 1993;40:125–130.
- [76] Pérez S, Vagnozzi A, Sur J, Odriozola E, Campero C, Odeón A. Análisis retrospectivo de casos con diagnóstico de necrosis cerebro cortical y su relación con herpesvirus bovino tipo 5. *Revista Argentina Microbiología*. 2003;35:69–73.
- [77] Lennette D. Recolección y preparación de muestras para exámenes virológicos. En: Lennette Ee, editor. Editorial Médica Panamericana and Buenos Aires, Argentina; 1987.
- [78] Carballal G, Oubiña J. Diagnóstico Viroológico. En: Carballal G, (eds) OJ, editor. El Ateneo, Buenos Aires; 1998.
- [79] Storch G. *Diagnostic Virology*. Knipe D, Howley P, editors. Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Estados Unidos; 2001.
- [80] Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, et al. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction sites analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985;230:1350–1354.
- [81] Mullis K, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 1987;155:335–350.
- [82] Atlas R, Bej A. *Polymerase Chain Reaction*. GERHARDT P WWKN MURRAY RGE, editor. American Society for Microbiology. United States; 1994.
- [83] Carballal G. *Virología: aspectos generales*. En: Carballal G, Oubiña Je, editors. El Ateneo and Buenos Aires; 1998.
- [84] Condit R. *Principles of Virology*. En: Fields B, Knipe D, Howley Pe, editors. Lippincott-Raven and Filadelfia; 2001.

- [85] Romera S, Hilgers L, Puntel M, Zamorano P, Alcon V, J DSM, et al. Adjuvant effects of sulfolipo-cyclodextrin in a squalane-in-water and water-in-mineral oil emulsions for BHV-1 vaccines in cattle. *Vaccine*. 2001;19:132–141.
- [86] Altschult S, Gish W, Miller W, Myres E, Lipman D. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215:403–410.
- [87] Walsh PS, Metzler D, Higuchi R. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques*. 1991;10:506–513.
- [88] Van Engelenburg F, Maes R, Van Oirschot J, Rijsewijk F. Development of a rapid and sensitive Polymerase Chain Reaction Assay for detection of Bovine Herpesvirus Type 1 in bovine semen. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993;31:3129–3135.
- [89] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T, Ludwig H. Commonly Used Techniques in Molecular Cloning. En: Ford N, Nolan C, Ferguson Me, editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press and New York. EEUU; 1989.
- [90] Santurde G, Da Silva N, Villares R, Tabarés E, Solana A, Bautista J, et al. Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Veterinary Microbiology*. 1996;49:81–92.
- [91] López de Ullibarri Galparsoro I, Pita Fernández S. Medidas de concordancia: el índice Kappa. *Cadena de Atención Primaria*. 1999;6:169–171.
- [92] Belknap E, Collins J, Ayers V, Schultheiss P. Experimental Infection of Neonatal Calves with Neurovirulent Bovine Herpesvirus Type 1.3. *Veterinary Pathology*. 1994;31:358–365.
- [93] Hall W, Simmons G, French E, Snowdon W, Asdell M. The pathogenesis of encephalitis caused by the infectious bovine rhinotracheitis virus. *Australian Veterinary Journal*. 1966;42:229–237.
- [94] Bagust J, Clark L. Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *J Comp Path*. 1972;82:375–383.

- [95] Pérez S, Bretshneider G, Leunda M, Osorio F, Flores E, AC O. Primary Infection, Latency, and Reactivation of Bovine Herpesvirus Type 5 in the Bovine Nervous System. *Veterinary Pathology*. 2002;39:437–444.
- [96] Kwok R S & Higuchi. Avoiding false positive with PCR. *Nature*. 1989;339:237–238.
- [97] Silveira Flores Vogel F, Caron L, Furtado Flores E, Weiblen R, Winkelmann E, Vanderli Mayer S, et al. Distribution of Bovine Herpesvirus Type 5 DNA in the Central Nervous Systems of Latently Experimentally Infected Calves. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41:4512–4520.
- [98] Silveira Flores Vogel F, Flores E, Weiblen R, Winkelmann E, Moraes M, Braganca J. Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. *Veterinary Microbiology*. 2004;98:185–196.
- [99] Caron L, Flores E, Weiblen R, Scherer C, Irigoyen L, Roehe P, et al. Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. *Veterinary Microbiology*. 2004;84:285–295.
- [100] Choudhury S, Lee B, Ozkul A, Weiss M. Bovine Herpesvirus 5 Glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. *Journal of Virology*. 2000;74:2094–2106.
- [101] Pastoret P, Aguilar-Setien A, Burtonboy G, Mager J, Jetteur P, Schoenaers F. Effect of repeated treatment with dexamethasone with the re-excretion pattern of infectious bovine rhinotracheitis virus and humoral immune response. *Veterinary Microbiology*. 1979;4:149–155.
- [102] Van Eengelenburg F, Maes R, Van Oirschot J, Rijsewijk F. Development of a rapid and positive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993;31:3129–3135.

- [103] Gee A, Wagner L, Hage J. The use of a polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Microbiology*. 1996;53:163–168.
- [104] Ros C, Riquelme M, Öhman Forslund K, Belák S. Improved detection of five closely related ruminant alphaherpesvirus by specific amplification of viral genomic sequences. *Journal of Virological Methods*. 1999;83:55–65.

Apéndice A

Anexo I: Datos epidemiológicos

A.1. Relevamiento serológico

Debido a que los datos bibliográficos de prevalencia de BHV-1 en Argentina han sido publicados al principio de la década del 80 [72, 69], se consideró conveniente realizar un estudio serológico a partir de muestras de bovinos lecheros provenientes de las tres principales provincias productoras: Santa Fé, Córdoba y Buenos Aires. Para ello se analizaron serológicamente 934 animales que no habían sido vacunados contra BHV en los últimos 12 meses previos a la extracción de la muestra. La técnica utilizada fue el ELISA indirecto descrito en el apartado 2.1.1.

A.1.1. Muestras provenientes de la provincia de Santa Fé

Se utilizaron 396 muestras provenientes de tres regiones de esta provincia: *Costa Central*, *Región Integrada Sur* y *Cuenca Oeste*. En la Tabla A.1 se muestran los resultados obtenidos. En cada caso se indica el origen geográfico de cada rodeo, la cantidad de muestras positivas y negativas y el porcentaje de positivos en cada caso.

A.1.2. Muestras provenientes de la provincia de Buenos Aires

Se utilizaron 208 muestras provenientes de 4 tambos ubicados en diferentes localidades de la provincia: Gral Villegas, Pergamino, Saladillo y Luján. En la Tabla A.2 se muestran la cantidad de animales correspondientes a cada muestreo, los resultados obtenidos y el porcentaje de reactantes positivos en cada caso.

A.1.3. Muestras provenientes de la provincia de Córdoba

Se utilizaron 248 muestras de 5 establecimientos lecheros ubicados en distintas localidades de la provincia de Córdoba: Freyre, Córdoba, Arias, Canalis, Cintra. En la Tabla A.3 se muestran la cantidad de animales correspondientes a cada muestreo, los resultados obtenidos y el porcentaje de positivos en cada rodeo muestreado.

Como puede observarse en las Tablas A.1, A.2 y A.3, los porcentajes de serología positiva

Tabla A.1: *Serología de BHV. Provincia de Santa Fé*

Región	Origen	n	Muestras +	Muestras -	% +
	Santa Fé	46	31	15	67,4
	López	24	21	3	87,5
	San Carlos C.	17	8	9	47
	Esperanza	79	52	27	65,82
	Bouquet	25	20	5	80
Costa C.	Subtotales	191	132	59	69,1
	Hughes	24	15	9	62,5
	Rosario	28	7	21	25
	Totoras	9	8	1	88,88
	Castellanos	30	13	17	43,33
	Eguzquiza	73	35	38	47,94
R. Int. Sur	Subtotales	164	78	86	47,5
	Rafaela	69	35	34	50,7
	Frank	28	5	23	17,85
	San Cristóbal	14	11	3	78,57
	San Guillermo	10	0	10	0
	Sunchales	10	1	9	10
	Villa Trinidad	20	19	1	95
Central O.	Subtotales	151	71	80	47,01
Pcia. Santa Fé	Totales	506	281	225	55,53

Tabla A.2: *Serología de BHV. Provincia de Buenos Aires*

Origen	Núm. de muestras	Muestras positivas	Muestras negativas	% +
Gral. Villegas	31	23	8	74,2
Pergamino	113	90	23	79,6
Saladillo	29	21	8	72,4
Luján	25	1	24	4
Totales	198	135	63	68,18

Tabla A.3: **Serología de BHV. Provincia de Córdoba**

Origen	Núm. de muestras	Muestras positivas	Muestras negativas	% +
Freyre	50	34	16	68
Córdoba	34	26	8	76,47
Arias	35	35	0	100
Canals	51	32	19	62,7
Cintra	78	63	15	80,7
Totales	248	190	58	76,6

correspondientes a las provincias de Santa Fé, Buenos Aires y Córdoba, se presentaron con rangos de 0-88.88, 7-79.6 y 62.7-100, respectivamente. Por otro lado, los porcentajes totales fueron 55.53, 68.18 y 76.6 en cada caso.

En las figuras A.1 y A.2 se muestran los puntos geográficos correspondientes a cada uno de los muestreos.

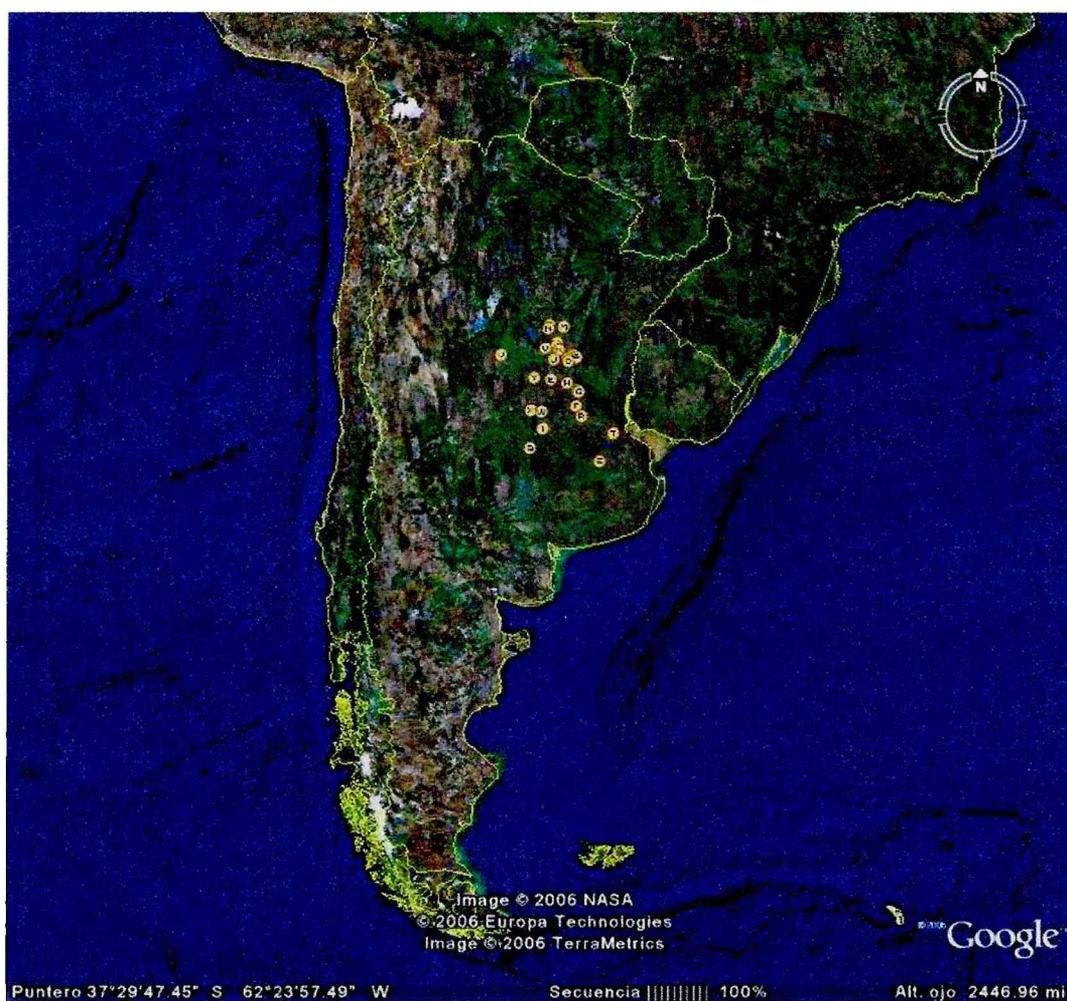


Figura A.1: Estudios serológicos. Área geográfica muestreada.



Figura A.2: Detalle de la localización geográfica de los establecimientos muestreados. A: Santa Fé, B: López, C: San Carlos Centro, D: Esperanza, E: Bouquet, F: Hughes, G: Rosario, H: Totoras, I: Castellanos, J: Eguzquiza, K: Rafaela, L: Frank, M: San Cristóbal, N: San Guillermo, O: Sunchales, P: Villa Trinidad, Q: General Villegas, R: Pergamino, S: Saladillo, T: Luján, U: Freyre, V: Córdoba, W: Arias, X: Canals, Y: Cintra.

Apéndice B

Anexo II: BLAST

B.1. Análisis de *primers diseñados*

A continuación se muestran los resultados obtenidos a partir de la comparación de los *primers* diseñados con todas las secuencias disponibles en *GenBank* mediante la utilización del programa *Blast* (*Basic Local Alignment Search Tool*, [86]). En todos los casos se muestra una lista de los principales alineamientos y, más detalladamente, algunos alineamientos de interés de los *primeros* GD-33, GD-623 y GD-632.

B.1.1. Análisis del *primer GC-1*

GC-1: 5'-TGCCCCCGCCTTCGCTTTC-3'

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 3,106,795 sequences; 13,976,746,995 total letters.

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 1173639 gb U35883.1 BHU35883 Bovine herpesvirus 5 glycoprotei...	38	0.004
gi 33772319 gb AY261359.1 Bovine herpesvirus 5 strain SV507/99,...	38	0.004
gi 62126203 gb AE017220.1 Salmonella enterica subsp. enterica s...	34	0.060
gi 56160984 gb CP000002.2 Bacillus licheniformis ATCC 14580, co...	28	3.7
gi 11024985 gb U75930.2 OPU75930 Orgyia pseudotsugata multicapsi...	28	3.7
gi 27368087 gb AY168637.1 Baboon herpesvirus 2 strain X313/860 ...	28	3.7
gi 1063687 gb U39145.1 OPU39145 Orgyia pseudotsugata nuclear pol...	28	3.7
gi 40019122 gb AY386263.1 Orf virus strain OV-IA82, complete ge...	28	3.7

B.1.2. Análisis del *primer GC-2*

GC-2: 5'-GCGTCTCGTCCGTCGTGCT-3'

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 3,106,795 sequences; 13,976,746,995 total letters.

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 27752286 gb AY052396.1 Bovine herpesvirus 5 glycoprotein C g...	38	0.004
gi 804968 emb Z49224.1 BHV5GC Bovine herpesvirus type 5 gene for...	38	0.004
gi 1173639 gb U35883.1 BHU35883 Bovine herpesvirus 5 glycoprotei...	38	0.004
gi 33772319 gb AY261359.1 Bovine herpesvirus 5 strain SV507/99,...	38	0.004
gi 20178619 gb AF232689.2 Rat cytomegalovirus Maastricht, compl...	32	0.24
gi 42517349 gb AY521625.1 Singapore grouper iridovirus, complet...	28	3.7
gi 18426922 gb AF170726.2 Myxoma virus strain Lausanne, complet...	28	3.7

B.1.3. Análisis del primer GD-33

GD-33: 5'-CAGTTTCCCCTACCCCAACC-3'

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 3,054,303 sequences; 13,775,297,266 total letters.

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 1483225 emb X99755.1 BHV5US4 Bovine herpesvirus 5 US4 gene	42	4e-04
gi 641976 gb U14656.1 BHU14656 Bovine herpesvirus type 5 glycop...	42	4e-04
gi 33772319 gb AY261359.1 Bovine herpesvirus 5 strain SV507/99,...	42	4e-04
gi 62126203 gb AE017220.1 Salmonella enterica subsp. enterica s...	28	5.5
gi 7960755 emb AJ133739.1 BVI133739 Bovine viral diarrhea virus ...	28	5.5
gi 7960753 emb AJ133738.1 BVI133738 Bovine viral diarrhea virus ...	28	5.5
gi 55724858 emb AJ781045.1 Bovine viral diarrhea virus partial ...	28	5.5
gi 2935210 gb AF030154.1 Bovine adenovirus 3 complete genome	28	5.5
gi 323205 gb M31182.1 BVDCG Bovine viral diarrhea virus complete...	28	5.5
gi 209938 gb K01264.1 ADRH6X Bovine adenovirus type 3 (BAV-3) he...	28	5.5

ALINEAMIENTOS

>gi|62126203|gb|AE017220.1| Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesuis str. SC-B67, complete genome. Length = 4755700 Score = 28.2 bits (14). Expect = 5.5. Identities = 14/14 (100%). Strand = Plus / Minus.

```

Query: 8      c c c t a c c c c c a a c c      21
              | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 1289209 c c c t a c c c c c a a c c      1289196
    
```

>gi|7960755|emb|AJ133739.1|BVI133739 Bovine viral diarrhea virus complete RNA genome, non-cytopathic isolate NADL. Length = 12308 Score = 28.2 bits (14). Expect = 5.5. Identities = 14/14 (100%). Strand = Plus / Minus.

```

Query: 7      c c c c t a c c c c c a a c      20
              | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 8108   c c c c t a c c c c c a a c      8095
    
```

>gi|7960753|emb|AJ133738.1|BVI133738 Bovine viral diarrhea virus complete RNA genome, isolate

NADL. Length = 12578 Score = 28.2 bits (14). Expect = 5.5. Identities = 14/14 (100%). Strand = Plus / Minus.

```

Query: 7      c c c c t a c c c c c a a c 20
             | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 8378   c c c c t a c c c c c a a c 8365
    
```

B.1.4. Análisis del *primer* GD-1

GD-1: 5'-GCCCGCAGTTTCCCCTACC-3'

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 3,054,303 sequences; 13,775,297,266 total letters.

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 1483225 emb X99755.1 BHV5US4 Bovine herpesvirus 5 US4 gene	38	0.090
gi 641976 gb U14656.1 BHU14656 Bovine herpesvirus type 5 glycopr...	38	0.090
gi 33772319 gb AY261359.1 Bovine herpesvirus 5 strain SV507/99,...	38	0.090
gi 33354292 gb AC111653.8 Rattus norvegicus 2 BAC CH230-108E11 ...	34	1.4
gi 40882614 gb AC115410.4 Rattus norvegicus 2 BAC CH230-46P5 (C...	34	1.4
gi 33354295 gb AC098563.6 Rattus norvegicus 1 BAC CH230-123A15 ...	32	5.5
gi 32489748 emb AL662996.3 OSJN00198 Oryza sativa genomic DNA, c...	32	5.5
gi 62195123 gb AE017223.1 Brucella abortus biovar 1 str. 9-941 ...	32	5.5
gi 50758149 ref XM_415783.1 PREDICTED: Gallus gallus similar to...	32	5.5
gi 42632302 dbj BA000028.3 Oceanobacillus iheyensis HTE831 DNA,...	32	5.5

B.1.5. Análisis del *primer* GD-2

GD-2: 5'-CGCACCCGCTCTCAATCTT-3'

Dabase: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, SS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 3,054,303 sequences; 13,775,297,266 total letters.

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 641976 gb U14656.1 BHU14656 Bovine herpesvirus type 5 glycopr...	38	0.090
gi 33772319 gb AY261359.1 Bovine herpesvirus 5 strain SV507/99,...	38	0.090
gi 19909474 gb AC098723.3 Mus musculus BAC clone RP23-3D10 from...	32	5.5
gi 13277947 gb BC003841.1 Mus musculus transient receptor poten...	32	5.5
GD-33 gi 56542300 gb AC149367.2 Phakopsora pachyrhizi clone JGIAFNA-5...	32	5.5
gi 41034043 emb BX005307.12 Zebrafish DNA sequence from clone D...	32	5.5
gi 51895988 gb BC082318.1 Mus musculus cDNA clone MGC:90691 IMA...	32	5.5
gi 1418554 emb Z75544.1 CEK02A11 Caenorhabditis elegans cosmid K...	32	5.5
gi 28981361 gb BC048873.1 Mus musculus, clone IMAGE:5354227, mRNA	32	5.5
gi 45219806 gb BC067003.1 Mus musculus transient receptor poten...	32	5.5
gi 40539131 gb AC132297.4 Mus musculus chromosome 7 clone RP24-...	32	5.5
gi 46102597 ref XM_380179.1 Gibberella zeae PH-1 strain PH-1; N...	32	5.5
gi 55251541 gb AC150275.2 Mus musculus BAC clone RP23-409M16 fr...	32	5.5
gi 58036541 gb AC149384.2 Phakopsora pachyrhizi clone JGIAFNA-5...	32	5.5
gi 12858176 dbj AK018463.1 Mus musculus 16 days embryo lung cDN...	32	5.5

B.1.6. Análisis del *primer* GD-3

GD-3: 5'-CCCGACGAGGCTATATACCC-3'

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 3,182,351 sequences; 14,207,478,348 total letters.

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gi 641976 gb U14656.1 BHU14656 Bovine herpesvirus type 5 glyco...	40.1	0.001
gi 33772319 gb AY261359.1 Bovine herpesvirus 5 strain SV507/99,	40.1	0.001

B.1.7. GD-623

GD-623: 5'-AGTGCTTCTTGGGGTTCGCACT-3'

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 3,054,303 sequences; 13,775,297,266 total letters.

Sequences producing significant alignments	Score (bits)	E Value
gi 33284772 emb AJ496608.1 HER496608 Bubaline herpesvirus 1 part...	42	4e-04
gi 5668985 gb AF078732.1 AF078732 Bovine herpesvirus 5 N565 glyco...	42	4e-04
gi 641976 gb U14656.1 BHU14656 Bovine herpesvirus type 5 glycopr...	42	4e-04
gi 33772319 gb AY261359.1 Bovine herpesvirus 5 strain SV507/99,...	42	4e-04
gi 40890049 gb AY437088.1 Caprine herpesvirus 1 strain E/CH gly...	34	0.089
gi 5668987 gb AF078734.1 AF078734 Caprine herpesvirus 1 E/CH gly...	34	0.089
gi 15216207 emb AJ290955.1 PHE290955 Phocid herpesvirus-1, strai...	28	5.5
gi 806593 emb X80588.1 TYUVENV Tyuleniy Virus gene for envelope	28	5.5

ALINEAMIENTOS

>gi|33284772|emb|AJ496608.1|HER496608 Bubaline herpesvirus 1 partial gD gene for lycoprotein D.

Length = 560 Score = 42.1 bits (21). Expect = 4e-04. Identities = 21/21 (100%). Strand = Plus / Plus.

```

Query: 1   a g t g c g a c c c c a a g a a g c a c t 21
          | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 239 a g t g c g a c c c c a a g a a g c a c t 259
    
```

>gi|40890049|gb|AY437088.1| Caprine herpesvirus 1 strain E/CH glycoprotein D gene, complete cds; and glycoprotein I gene, partial cds. Length = 1771 Score = 34.2 bits (17). Expect = 0.089. Identities = 20/21 (95%). Strand = Plus / Plus.

```

Query: 1   a g t g c g a c c c c a a g a a g c a c t 21
          | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 667 a g t g c g a c c c c a a t a a g c a c t 687
    
```

>gi|5668987|gb|AF078734.1|AF078734 Caprine herpesvirus 1 E/CH glycoprotein D precursor, gene, partial cds. Length = 573 Score = 34.2 bits (17). Expect = 0.089. Identities = 20/21 (95%). Strand = Plus / Plus.

```

Query: 1   a g t g c g a c c c c a a g a a g c a c t 21
          | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 248 a g t g c g a c c c c a a t a a g c a c t 268
    
```

B.1.8. Análisis del *primer* GD-632

GD-632: 5'-CAGTACCCGAAGTGCTTCTTG-3'

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 3,178,933 sequences; 14,192,497,332 total letters.

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 33284772 emb AJ496608.1 HER496608 Bubaline herpesvirus 1 part...	42	0.009
gi 5668985 gb AF078732.1 AF078732 Bovine herpesvirus 5 N565 glyc...	42	0.009
gi 641976 gb U14656.1 BHU14656 Bovine herpesvirus type 5 glycopr...	42	0.009
gi 33772319 gb AY261359.1 Bovine herpesvirus 5 strain SV507/99,...	42	0.009
gi 5668986 gb AF078733.1 AF078733 Rangiferine herpesvirus 1 Sall...	38	0.14
gi 5668988 gb AF078735.1 AF078735 Cervid herpesvirus 1 Banffshir...	36	0.55

ALINEAMIENTOS

>gi|33284772|emb|AJ496608.1|HER496608 Bubaline herpesvirus 1 partial gD gene for glycoprotein D. Length = 560 Score = 42.1 bits (21). Expect = 0.009. Identities = 21/21 (100%). Strand = Plus / Minus.

```

Query: 1   c a g t a c c c g a a g t g c t t c t t g 21
          | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 269 c a g t a c c c g a a g t g c t t c t t g 249
    
```

>gi|5668986|gb|AF078733.1|AF078733 Rangiferine herpesvirus 1 Salla 82 glycoprotein D precursor,

gene, partial cds Length = 573 Score = 38.2 bits (19). Expect = 0.14. Identities = 19/19 (100%). Strand = Plus / Minus.

```

Query: 1   c a g t a c c c g a a g t g c t t c t 19
          | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 278 c a g t a c c c g a a g t g c t t c t 260
    
```

>gi|5668988|gb|AF078735.1|AF078735 Cervid herpesvirus 1 Banffshire 82 glycoprotein D precursor, gene, partial cds. Length = 537 Score = 36.2 bits (18). Expect = 0.55. Identities = 18/18 (100%). Strand = Plus / Minus.

```

Query: 1   c a g t a c c c g a a g t g c t t c 18
          | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 263 c a g t a c c c g a a g t g c t t c 246
    
```

B.2. Análisis *primers* previamente publicados

Los *primers* obtenidos a partir de bibliografía también fueron analizados mediante el programa *Blast*, [86]. En el análisis de los *primers* TK-1/TK-2 se muestra la lista de los principales alineamientos. Para el par O-1/O-2 se muestran en detalle los primeros tres alineamientos no correspondientes a BHV-1y BHV-5.

B.2.1. Análisis del *primer* TK-1

TK-1: 5'-AGACCCAGTTGTGATGAATGC-3'

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)3,054,303 sequences; 13,775,297,266 total letters.

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 2653291 emb AJ004801.1 BHV1CGEN Bovine herpesvirus type 1.1 c...	44	9e-05
gi 1491620 emb Z78205.1 BHT1UL Bovine herpesvirus type 1 UL22-35...	44	9e-05
gi 221806 dbj D00438.1 HSBTK6 Bovine herpesvirus type 1 gene for...	44	9e-05
gi 5459453 dbj AB029581.1 Feline calicivirus gene for capsid pr...	36	0.022
gi 5459499 dbj AB029604.1 Feline calicivirus gene for capsid pr...	34	0.089
gi 20069345 gb AF491742.1 HIV-1 clone UK1br-32 from United King...	30	1.4
gi 13559481 dbj AB059316.1 Human immunodeficiency virus type 1 ...	30	1.4
gi 31071711 gb AF385975.1 HIV-1 96SG6303 from Singapore envelop...	28	5.5
gi 51492436 gb AY695933.1 Carrot red leaf virus strain UK-1, co...	28	5.5
gi 48869118 gb AY611024.1 Zucchini yellow mosaic virus isolate ...	28	5.5

B.2.2. Análisis del *primer* TK-2

TK-2: 5'-ACACGTCCAGCACGAACACC-3'

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 3,054,303 sequences; 13,775,297,266 total letters.

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 2653291 emb AJ004801.1 BHV1CGEN Bovine herpesvirus type 1.1 c...	40	0.023
gi 1491620 emb Z78205.1 BHT1UL Bovine herpesvirus type 1 UL22-35...	40	0.023
gi 221806 dbj D00438.1 HSBTK6 Bovine herpesvirus type 1 gene for...	40	0.023
gi 21707069 gb BC033735.1 Homo sapiens protocadherin alpha 5, m...	34	1.4
gi 34190683 gb BC036674.2 Homo sapiens protocadherin alpha 6, m...	34	1.4
gi 55625141 ref XM_527033.1 PREDICTED: Pan troglodytes protocad...	34	1.4
gi 55625139 ref XM_527031.1 PREDICTED: Pan troglodytes protocad...	34	1.4
gi 55625137 ref XM_527030.1 PREDICTED: Pan troglodytes protocad...	34	1.4
gi 55625135 ref XM_527029.1 PREDICTED: Pan troglodytes protocad...	34	1.4
gi 55624973 ref XM_517982.1 PREDICTED: Pan troglodytes similar ...	34	1.4

B.2.3. Análisis del primer O-1

O-1: 5'-GCATGCGCGAGCAGTTACTTT-3'

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 3,054,303 sequences; 13,775,297,266 total letters.

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 2653291 emb AJ004801.1 BHV1CGEN Bovine herpesvirus type 1.1 c...	42	4e-04
gi 33772319 gb AY261359.1 Bovine herpesvirus 5 strain SV507/99,...	42	4e-04
gi 330769 gb M84465.1 HSBP135B Bovine herpesvirus type 1 p135 pr...	42	4e-04
gi 330767 gb M84464.1 HSBP135A Bovine herpesvirus type 1 p135 pr...	42	4e-04
gi 330764 gb M61143.1 HSBLRAA Bovine herpesvirus type 1 latency-...	42	4e-04
gi 17484022 gb AF447491.1 Bacteriophage phiE125, complete genome	28	5.5
gi 56160984 gb CP000002.2 Bacillus licheniformis ATCC 14580, co...	28	5.5
gi 50299775 emb AJ577339.1 SMI577339 Strawberry mild yellow edge...	28	5.5
gi 50299772 emb AJ577338.1 SMI577338 Strawberry mild yellow edge...	28	5.5
gi 50299769 emb AJ577337.1 SMI577337 Strawberry mild yellow edge...	28	5.5

ALINEAMIENTOS

>gi|17484022|gb|AF447491.1| Bacteriophage phiE125, complete genome. Length = 53373 Score = 28.2 bits (14). Expect = 5.5. Identities = 14/14 (100%). Strand = Plus / Plus.

```

Query: 3      a t g c g c g a g c a g t t      16
             | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 46463  a t g c g c g a g c a g t t      46476
    
```

>gi|56160984|gb|CP000002.2| Bacillus licheniformis ATCC 14580, complete genome. Length = 4222334 Score = 28.2 bits (14). Expect = 5.5. Identities = 14/14 (100%). Strand = Plus / Minus.

```

Query: 2      c a t g c g c g a g c a g t      15
              | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 1576910 c a t g c g c g a g c a g t      1576897
    
```

>gi|50299775|emb|AJ577339.1|SMI577339 Strawberry mild yellow edge virus cp gene for coat protein and partial TGBp3 gene for triple gene block protein 3, genomic RNA, isolate 3CH Length= 878 Score = 28.2 bits (14). Expect = 5.5. Identities = 14/14 (100%). Strand = Plus / Minus.

```

Query: 1      g c a t g c g c g a g c a g      14
              | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 405    g c a t g c g c g a g c a g      392
    
```

B.2.4. Análisis del primer O-2

O-2: 5'-CGAGAGCTCGGCGCAGAAGA-3'

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 3,054,303 sequences; 13,775,297,266 total letters.

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 2653291 emb AJ004801.1 BHV1CGEN Bovine herpesvirus type 1.1 c...	40	0.023
gi 330769 gb M84465.1 HSBP135B Bovine herpesvirus type 1 p135 pr...	40	0.023
gi 330767 gb M84464.1 HSBP135A Bovine herpesvirus type 1 p135 pr...	40	0.023
gi 330764 gb M61143.1 HSBLRAA Bovine herpesvirus type 1 latency-...	40	0.023
gi 33772319 gb AY261359.1 Bovine herpesvirus 5 strain SV507/99,...	36	0.35
gi 9950097 gb AE004809.1 Pseudomonas aeruginosa PAO1, section 3...	34	1.4
gi 46197378 gb AE017306.1 Thermus thermophilus HB27 section 6 o...	34	1.4
gi 55771382 dbj AP008226.1 Thermus thermophilus HB8 genomic DNA...	34	1.4
gi 47118316 dbj BA000040.2 Bradyrhizobium japonicum USDA 110 DN...	34	1.4
gi 155080 gb M59180.1 TTHCAA T.thermophilus cytochrome caa3 oxi...	34	1.4

ALINEAMIENTOS

>gi|9950097|gb|AE004809.1| Pseudomonas aeruginosa PAO1, section 370 of 529 of the complete genome. Length = 10623 Score = 34.2 bits (17). Expect = 1.4. Identities = 17/17 (100%). Strand = Plus / Minus.

```

Query: 2      c t t c t g c g c c g a g c t c t      18
              | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 9534    c t t c t g c g c c g a g c t c t      9518
    
```

>gi|46197378|gb|AE017306.1| Thermus thermophilus HB27 section 6 of 7 of the complete genome. Length = 276289 Score = 34.2 bits (17). Expect = 1.4. Identities = 17/17 (100%). Strand = Plus / Minus.

```

Query: 2      c t t c t g c g c c g a g c t c t      18
              | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 215402 c t t c t g c g c c g a g c t c t      215386
    
```

>gi|55771382|dbj|AP008226.1| *Thermus thermophilus* HB8 genomic DNA, complete genome. Length = 1849742. Score = 34.2 bits (17). Expect = 1.4. Identities = 17/17 (100%). Strand = Plus / Plus.

```

Query: 2      c t t c t g c g c c g a g c t c t      18
              | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 299313 c t t c t g c g c c g a g c t c t      299329
    
```

