

Ciudad Obregón, Sonora, a 07 de junio de 2013

Instituto Tecnológico de Sonora

Presente.

El que suscribe **Alberto Urtusuastegui Ruiz**, por medio del presente manifiesto bajo protesta de decir verdad, que soy autor y titular de los derechos de propiedad intelectual tanto morales como patrimoniales, sobre la obra titulada: **“Uso de la biología molecular para la estandarización de la técnica de PCR en el diagnóstico de Herpesvirus Bovino Tipo I en el sur de Quiriego, Sonora”**, en lo sucesivo “LA OBRA”, misma que constituye el trabajo de tesis que desarrolle para obtener el grado de **Médico Veterinario Zootecnista** en ésta casa de estudios, y en tal carácter autorizo al Instituto Tecnológico de Sonora, en adelante “EL INSTITUTO”, para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios del objeto del Instituto, es decir, sin fines de lucro, por lo que la presente autorización la extiendo de forma gratuita.

Para efectos de lo anterior, EL INSTITUTO deberá reconocer en todo momento mi autoría y otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente en LA OBRA.

De igual forma, libero de toda responsabilidad al EL INSTITUTO por cualquier demanda o reclamación que se llegase a formular por cualquier persona, física o moral, que se considere con derechos de autor sobre los resultados derivados de la presente autorización, o por cualquier violación a los derechos de autor y propiedad intelectual que cometa el suscrito frente a terceros con motivo de la presente autorización y del contenido de la misma obra.

Alberto Urtusuastegui Ruiz

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA





INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA
Educar para Trascender

“Uso de la biología molecular para la
estandarización de la técnica de PCR en el
diagnóstico de Herpesvirus Bovino Tipo I en
el sur de Quiriego Sonora”

Tesis

Que para obtener el título de

MVZ

Presenta

Alberto Urtusuastegui Ruiz

Ciudad Obregón, Sonora

Junio

Uso de la biología molecular para la
estandarización de la técnica de PCR en el
diagnóstico de Herpesvirus Bovino Tipo I en el
sur de Quiriego Sonora

TEMA DE TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

Alberto Urtusuastegui Ruiz

Ph.D. Javier Rolando Reyna Granados

ASESOR

Vo Bo.

M.D.I. RICARDO JIMÉNEZ NEVÁREZ

COORDINADOR DE LA CARRERA MVZ

COMITÉ

PRESIDENTE

SECRETARIO

VOCAL

DEDICATORIAS

“Este humilde trabajo lo dedico con todo cariño y amor a todas aquellas personas que estuvieron involucradas en el desarrollo de mi carrera, a aquellas personas que creyeron en mí, que quisieron un mejor futuro para mí y aquellas que siempre me recordaban en sus oraciones.”

A Dios primeramente porque me dio la oportunidad de estudiar y disfrutar lo que realmente amo que es esta hermosa y maravillosa carrera, por estar conmigo a mi lado dándome la fortaleza que necesito para seguir adelante y llenarme de bendiciones a lo largo de mi vida, y te pido Señor Jesucristo que iluminado por el espíritu santo y cobijado por la virgen maría que me des sabiduría para hacer lo mejor de mi profesión y actué de acuerdo a tu voluntad. Gracias padre mío.

A mis padres con mucho cariño y amor se los dedico por su amor, apoyo, paciencia que me han tenido a lo largo de estos años, los cuales han permitido el desarrollo de mi vida profesional y han estado en todo momento Gracias papá **Alberto Urtusuastegui Bon** y mamá **Francisca Guadalupe Ruiz Ruiz**, por darme la vida, por hacerme un hombre de provecho y por la confianza que han depositado en mí a pesar de los tropiezos que he tenido. Por darme una carrera para mi futuro y sobre todo creer en mí, aunque han pasado momentos difíciles siempre han estado apoyándome y brindándome todo su amor, no tengo palabras para agradecerle todo lo que han hecho por mí y mis hermanos que.

Doy gracias a Dios por ponerlos en mi camino los cuales fueron un ejemplo de fortaleza y humildad y sobre todo un gran ejemplo de lucha y ganas de seguir adelante y alcanzar las metas propuestas. Le pido a Dios que los conserve y los llene de bendiciones, y hoy que culmina este camino y que logró salir y ver terminada una de mis grandes metas comparto este triunfo con ustedes, y porque gracias a ustedes padres los he conseguido.

A mis hermanos Alexia Guadalupe Urtuzuastegui Ruiz y Juan Carlos Urtuzuastegui Ruiz por estar conmigo y haber compartido sus vidas momentos inolvidables, que Dios los bendiga siempre y logren cumplir sus metas espero estar ahí para apoyarlos siempre y devolverles los favores que me han hecho sobre todo mi hermana que me ayudaba en la elaboración de maquetas o dibujos que me pedían a lo largo de la carrera.

A mis abuelos su gran cariño y apoyo que me han dado, Artemisa Ruiz Ruiz, Refugió Ruiz Torres, María de los Ángeles Bon Garcia, y Gilberto Urtuzuastegui. A mis tíos y primos. En especial **a mis tíos** Carlos Gerardo Ruiz Ruiz, Juan Gabriel Urtuzuastegui que más que como tíos los vi como primos y hermanos, su gran apoyo que me dieron no solo económico sino también de consejos y valores Dios los bendiga siempre.

A mi Novia, Brenda Alicia Vélez Gutiérrez, por ser parte importante de mi vida y porque serás la madre de mis hijos, si Dios me lo permite. Doy gracias a Dios por ponerte en mi camino por qué contigo aprendí a ver la vida de un color más bello, lo cual me motivo a seguir siempre adelante, tus consejos, tu apoyo y sobre todo tu amor incondicional fueron siempre un gran motivo para que yo lograra terminar esta carrera y ver cumplido mis sueños el cual comparto contigo y con la futura familia que formaremos. Dios te llene de bendiciones siempre y a su familia también que también me han apoyado a mí en mi crecimiento profesional **a mis suegros Sandor y Alicia** por su amistad y quererme como un hijo. Y sus hermanas **Perla, Sandra, Daniela, Vanessa** que me apoyaron y las quiero como hermanas mía.

A mis amigos Erick Parra, Humberto Cortes, Jesús Cejudo, Alberto Lucas Pillado, Omar Leal y Fernando López de Tamaulipas que fueron personas que me encontré a lo largo de mi vida y me dieron su amistad desinteresadamente por su apoyo y oraciones que Dios los bendiga siempre en todos sus proyectos, al grupo juvenil de san francisco de renovación carismática en el espíritu santo, y a los frailes por su gran ejemplo de vida.

A mi asesor el Doctor Javier Rolando Reyna Granados por creer en mí y darme su apoyo a lo largo de su carrera, por compartir tantos conocimientos conmigo, por ser servicial y amable , por ser una persona con muchos valores , por tener la capacidad de entender y aceptar a las personas tal y como son.

Sobre todo brindarme su amistad y ser un gran ejemplo lo que en su futuro quiero llegar hacer. Muchas gracias y Dios los llene de bendiciones siempre. Y siga cosechando éxitos.

A mis revisores

Para la Doctora María Guadalupe Méndez, parece que fue ayer que entre a la carrera fue la primera maestra que me dio clase de la carrera ahí vi ese primer día un gran ser humano una persona llena de virtudes sobre todo una gran maestra que sabe entender y lo que no cualquiera posee el Don de saber enseñar Gracias Doctora por sus enseñanzas y Dios la bendiga siempre a usted y su familia.

Para el Doctor Juan Francisco Hernández a pesar que no tuve la fortuna de ver sido su alumno, le agradezco por el apoyo que me dio a lo largo de esta investigación por sus consejos y la paciencia sobre todo que me dio , gracias y que Dios lo Bendiga.

A la **Doctora Verónica Ortiz** por sus consejos y enseñanzas de patología clínica, no fui su alumno en el salón de clases pero si fuera las gracias por todo y sobre todo gracias por brindarme su amistad.

A **Médico Pedro Alan** más que un maestro un amigo que me apoyó y asesoró a lo largo de la carrera.

A mis compañeros que fueron parte fundamental en esta carrera por los que me brindaron su amistad desinteresadamente y que hoy en día les puedo decir amigos a **Carlos Román, Ricardo zamorano, Alberto Chávez, Rosa Valdez, Rosa Beltrán, Bruno Santillanes, Ignacio Osorio, Ileana Yepiz, Janet, chan, Nallely Romero, Denise campillo, Anahí Bernal, Ana luz Leyva, Ramiro Campas, Bacame,** mi primo y hermano **Abel Ruiz.** Mi equipó de necropsia y cirugía que con ellos aprendí como es el trabajo en equipo, me faltaron muchos compañeros perdón por los que se me olvidaron pero les deseo lo mejor y le agradezco a Dios por ver compartido grandes momentos con ustedes.

Hacer un alto en el camino, detenerte a pensar y visualizar donde quieres llegar, es una práctica fundamental de quienes consiguen lo que se propone. E.A KUBLI

AGRADECIMIENTOS

A MI ASESOR

Phd. Javier Rolando Reyna granados

A MIS REVISORES

MC María Guadalupe Méndez Castillo

Dr. Juan Francisco Hernández Chávez

COORDINADOR DE LA CARRERA

MC MDIE Ricardo Jiménez Nevares

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURA.....	<i>xi</i>
LISTA DE TABLAS.....	<i>xii</i>
RESUMEN.....	<i>xiii</i>
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. Planteamiento del problema.....	2
1.3 Objetivos.....	3
1.4 Justificación.....	3
1.5 Limitaciones del estudio.....	4
1.6 Hipótesis.....	4
II. MARCO DE LA INVESTIGACIÓN.....	5
2.1. Definición.....	5
2.2 Etiología.....	5
2.3 Clasificación.....	6
2.3.2 Características del virus.....	6
2.3.3 Organización de genoma.....	6
2.3.4 Genoma del Virus.....	6
2.3.5 Genotipo del VHB-1.....	10
2.3.6 Glicoproteínas de la envoltura.....	10
2.3.7 Glicoproteína I (gI).....	11
2.4 Replicación viral.....	11
2.4.1 Ciclo de Replicación Viral.....	12
2.5 Patogenia.....	12
2.5.1 Signos y lesiones.....	14
2.6 Diagnóstico.....	15
2.6.1 Técnica de ELISA.....	16
2.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	17
2.6.2.1 ADN diana.....	23
2.6.2.2 Diseño del Cebadores.....	24
2.6.3 Electroforesis Convencional en gel de Agarosa.....	25
2.7 Prevención y Control.....	26

2.8 Medidas Sanitarias.....	26
2.9 Vacunas y plan de vacunación.....	26
2.9.1 Vacunas convencionales.....	27
2.9.2 Vacunas a virus vivos modificados.....	27
2.9.3 Vacunas a virus inactivados.....	27
2.9.4 Vacunas marcada.....	28
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
3.1 Localización del sitio experimental.....	29
3.2 Clasificación del estudio.....	30
3.3.1 Material biológico.....	30
3.3.2 Prueba de ELISA.....	30
3.4 Metodología.....	31
3.4.2 Extracción de ADN en suero.....	33
3.4.3 PCR.....	33
3.4.4 Electroforesis convencional en gel de agarosa.....	34
3.5 Variables a medir.....	34
V. RESULTADOS Y DISCUSION.....	35
4.1 Extracción de ADN.....	35
4.2 Diseño de los cebadores.....	36
4.3 Condiciones sistema de amplificación del PCR.....	36
4.4 Optimización de temperatura.....	37
4.5. Análisis de las muestras amplificadas por PCR.....	39
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	43
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	45

LISTA DE FIGURA

FIGURA 1.1 Organización de los bloques de genes.....	9
FIGURA 1.2. Gel de agarosa reacción final para PCR en buffer TAE.....	41

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones óptimas de amplificación del ADN.....	38
Tabla 2. Concentraciones finales.....	39

RESUMEN

Alberto Urtusuastegui Ruiz, Uso de la biología molecular para la estandarización de la técnica de PCR en el diagnóstico de Herpesvirus Bovino Tipo I en el sur de Quiriego Sonora. Asesor: **Javier Rolando Reyna Granados**

Una de las enfermedades virales que afecta a la productividad en explotaciones de ganado de carne y leche es causada por el virus Herpesvirus Bovino Tipo I mejor conocida como Rinotraqueitis Infecciosa Bovina que provoca problemas respiratorios en terneros y problemas reproductivos. La necesidad de obtener diagnósticos más certeros contra esta enfermedad, ha sido importante para los Médicos dedicados a la clínica de bovinos y para los productores. El uso de la biología molecular utilizando la Técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa ha permitido estandarizar, con alta sensibilidad, algunas pruebas para detectar enfermedades del ganado. Se trabajaron 10 sueros que se eligieron al azar de 30 muestras, para realizar la prueba de ELISA contra IBR, de los cuales se eligieron 5 muestras con más altos títulos, para estandarizar la prueba de PCR. Una vez extraído el ADN, por el método de columnas de extracción Quiagen (2010) se realizó la amplificación de la porción variable del genoma del virus IBR (gen I) obteniendo un fragmento de 468 pares de bases.

Con ello se comprueba que la técnica de PCR. Es más sensible, rápido, específica, menos laboriosa y más económica que la hibridación de ácidos nucleicos y que los métodos tradicionales de detección de este agente infeccioso. Es muy importante detectar el agente ya que la IBR conjuntamente con el complejo enfermedad de las mucosas/diarrea viral bovina y la Mamilitis deben ser descartadas en el esquema de diagnóstico de las enfermedades vesiculares de declaración obligatoria para la Organización Internacional de Epizootia (OIE) por presentar síntomas clínicos similares

I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo alcanzado por la ganadería en los últimos años ha estimulado la búsqueda de nuevos métodos de diagnóstico que garanticen mayor rapidez, especificidad y sensibilidad en la detección de las enfermedades que afectan al ganado. Entre ellas, las de origen viral constituyen un gran peligro, ya que al difundirse rápidamente ocasionan lamentables daños económicos (Delgado y col., 2005).

La producción del ganado bovino tanto de leche y carne para consumo humano, están siendo descuidadas por la poca importancia que se tiene con el manejo del bienestar animal, y muchos no quieren hacer inversiones en cuanto a la Medicina preventiva. En México existe ganado con enfermedades que interfieren en la producción y se hace énfasis en las enfermedades infecciosas del aparato respiratorio.

De las enfermedades virales que más incidencia tienen en los costos de producción de los bovinos se encuentran, la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y la vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV), enfermedades contagiosas que afectan a los bovinos de cualquier edad (Murphy y col., 1999; Thiry y col., 2006b).

El agente causal es el *Herpesvirus bovino tipo-1* (HVB-1) que pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus*.

El diagnóstico de laboratorio de estas enfermedades se realiza mediante el uso de muchos de los métodos clásicos de detección del agente infeccioso como el aislamiento viral e identificación posterior por neutralización viral o inmunohistoquímica.

Sin embargo el aislamiento viral requiere facilidades de cultivos celulares, la presencia del virus replicándose y mucho tiempo para la obtención de los resultados (Moore y col., 2000; Delgado, 2005). Actualmente, el PCR es una herramienta básica en la detección del ácido nucleico que permite un diagnóstico de la enfermedad de forma muy rápida, con elevada especificidad y sensibilidad.

1.2. Planteamiento del problema

La Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) ha causado pérdidas importantes a la ganadería, ya que afecta tanto en ganado de productores de leche y de carne, a causa de problemas respiratorios en terneros y problemas reproductivos y es uno de los causantes de abortos. Las pruebas actualmente utilizadas para el diagnóstico no son suficientemente sensibles y específicas por lo que se considera de primordial implementar métodos más efectivos que permitan un mejor diagnóstico.

Deka et al. (2005) y R.S. Kataria (1997) ambos en sus investigaciones extrajeron ADN en semen y corrieron la técnica de PCR con éxito con una excelente sensibilidad y especificidad, utilizando los cebadores de dichos autores el presente trabajo pretende estandarizar la técnica PCR para poder comprobar la presencia del agente. Debido a la necesidad de acudir a métodos de diagnóstico más rápidos y precisos que posibiliten tomar medidas efectivas,

1.3 Objetivos

Identificar el virus IBR mediante la estandarización de la técnica de PCR para ayudar a un mejor diagnóstico más certero, específico y sensible.

1.4 Justificación

En el Estado de Sonora la ganadería es una de las actividades pecuarias más importantes ya que el ganado bovino tiene gran capacidad para adaptarse a terrenos áridos y semiáridos comunes en esta región, lo cual implica una actividad de bajo costo comparada con otros animales.

Con la finalidad de mejorar los hatos se han introducido animales de alta calidad genética al estado de Sonora trayendo como consecuencia la introducción de nuevos agentes patógenos que interfieren en la salud de los animales disminuyendo la productividad de esta actividad pecuaria.

Debido a la falta de pruebas diagnosticas más sensibles, se necesita implementar pruebas de biología molecular con alta sensibilidad, para ayudar a generar un diagnostico más preciso a si poder apoyar a los productores que tengan resultados convincentes que permitan a los médicos desarrollar más y mejores métodos de control.

Por esto el presente trabajo tiene la finalidad de estandarizar la técnica de Cadena de Reacción de la Polimerasa (PCR), con ello identificar el virus Herpesvirus Bovino Tipo 1 con ello los ganaderos e investigadores podrán utilizar esta prueba para que puedan conocer mejor el estatus epidemiológico de la región.

1.5 Limitaciones del estudio

La principal limitación del presente estudio es la distancia que hay entre cada rancho lo cual dificulta el traslado, otra limitante es el costo de los kit de ELISA y la disponibilidad de reactivos para correr las pruebas tanto de ELISA como de PCR. Se necesitan pruebas más eficaces para detectar los problemas que se encuentran en la explotación, además un estudio para la identificación del virus.

1.6 Hipótesis

El uso de la técnica de PCR, es una herramienta de diagnóstico sensible y segura para la determinación de virus IBR.

II. MARCO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Definición

Se trata de una enfermedad de origen viral, producida por un herpes virus, infecciosa, muy contagiosa, de curso agudo, que afecta a los bovinos en primer lugar, a porcinos, caprinos y cérvidos. Aunque se considera una enfermedad de distribución mundial, la mayoría de los casos se han diagnosticado en América, África y Europa. Sin embargo, en varios países de este último continente se ha logrado erradicar (Martinez, 2007).

2.2 Etiología

La rinotraqueítis infecciosa bovina (RIB), conocida también como hocico rojo, es una infección de las vías respiratorias superiores y de la tráquea, causada por el Herpesvirus 1 bovino (Gomez, 2008)

2.3 Clasificación

Virus de DNA, clasificado como Herpes Tipo I (INTA 2002). Pertenece como *Varicellovirus* a la subfamilia *Alphaherpesviridae*, dentro de la familia *Herpesviridae* (Brunner, 2002).

2.3.2 Características del virus

Los herpesvirus son virus envueltos, tienen un diámetro de 150-200 nm, ADN doble cadena lineal y una cápsida con isometría icosaédrica de alrededor de 100 nm de diámetro compuesta de 162 capsómeros (150 hexámeros y 12 pentámeros). La cápsida está rodeada por una capa de material globular, conocido como tegumento, y alrededor de él, una envoltura que contiene las espículas de glicoproteínas virales en su superficie (Murphy y col., 1999).

2.3.3 Organización de genoma

El ácido nucleico de HVB-1 tiene una densidad de flotación de 1.73 g/cm³ en Cloruro de Cesio, un peso molecular de 138 kpb y un contenido de bases Guanina-Citosina (GC) de 72% (Black y Slack, 1972). Alrededor del 10% transporta en el extremo terminal derecho una "cola" de ADN celular, lo que indica que el material genético del virus puede recombinarse frecuentemente con el de la célula (Pidone y col., 1999).

2.3.4 Genoma del Virus

El genoma del VHB-1 codifica varias proteínas, estructurales y no estructurales, que son expresadas sobre la envoltura viral y sobre la membrana de las células infectadas (Franco et al., 2002).

La secuenciación del genoma de BoHV-1 se realizó entre 1991 y 1997 dentro del proyecto “The BHV-1 Genome Project”, enmarcado en un programa de cooperación internacional entre diferentes laboratorios (Schwyzer, 1995).

El genoma de HVB-1 codifica para alrededor de 70 proteínas de las cuales se ha demostrado que 33 son estructurales y alrededor de 15 son no estructurales (Manual de la OIE, 2004a; Fauquet y col., 2005).

El genoma del BoHV-1, como el de todos los miembros del género *Varicellovirus*, presenta una ordenación del tipo D que se caracteriza por la repetición interna y en orientación invertida de la secuencia de uno de los extremos de la molécula de DNA (Roizmanet y col ., 2001).

El genoma se distribuye en dos regiones únicas de 102.9 kb y 9.7 kb que se denominan UL (‘unique long’) y US (‘unique short’), respectivamente (Mayfield et al., 1983). Las secuencias repetidas se denominan TRS (‘terminal repeat short’) e IRS (‘internal repeat short’), comprenden 11.3 kb y flanquean la región US.

La ordenación del genoma tipo D no contempla en principio la presencia de secuencias repetidas en los extremos de la región UL. No obstante, la región UL del genoma de HHV-3, BoHV-1 y EHV-1 sí está flanqueada por pequeñas secuencias repetidas de 88, 24 y 32 pb, respectivamente, y en ocasiones sólo parcialmente homólogas como es el caso del SuHV-1 (Schynts et al., 2003).

Las secuencias TRS e IRS pueden recombinar entre sí durante la replicación del genoma. Esta recombinación conlleva un cambio de orientación de la región US con respecto a la región UL, y comporta la existencia de 2 isoformas posibles del genoma del BoHV-1: P ('prototype') e IS ('inverted US'). Estudios recientes indican sin embargo que la región UL del BoHV-1 también puede invertir su orientación y que en realidad son 4 las isoformas presentes en la molécula de DNA concatamérica (Schynts et al., 2003).

De estas 4 isoformas, casi exclusivamente se empaquetan las 2 que presentan la región UL en la orientación P (no invertida). Las dos isoformas mayoritarias del BoHV-1, P e IS, son funcionalmente equivalentes y se hallan en cantidades equimolares en toda extracción de DNA vírico. La presencia de estas isoformas es independiente del subtipo del BoHV-1. El genoma del BoHV-1 comprende 69 genes únicos repartidos entre US y UL, y otros 2 ambos duplicados, en TRS e IRS (Schwyzer & Ackermann, 1995).

Actualmente se conoce la secuencia genómica completa de 32 especies de herpesvirus. El análisis comparativo del genoma de las diferentes especies refleja que todos los herpesvirus conservan un grupo de 25-40 genes comunes. Estos genes se denominan genes 'core' y codifican para proteínas de regulación génica, enzimas de metabolismo de nucleótidos, componentes del complejo de replicación del DNA, proteínas de maduración del virión, proteínas de la cápside y algunas proteínas del tegumento y de la envoltura del virión. (Minson et al., 2000)

Los genes 'core' se agrupan en 7 bloques de genes conservados (bloque I a VII), manteniendo un orden y una orientación transcripcional dentro de cada bloque. Por otro lado, estos bloques presentan un orden y una orientación diferente en cada una de las subfamilias que componen la familia Herpesviridae (Figura 1.1).

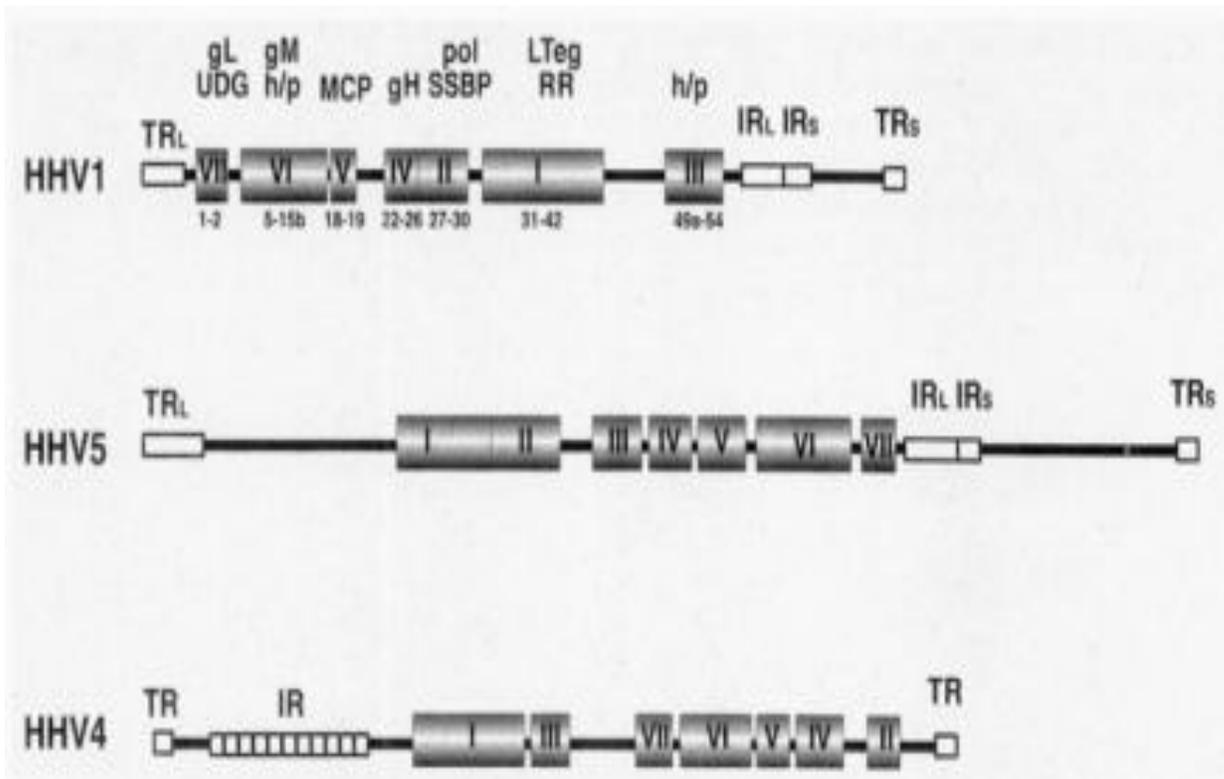


Figura 1.1 Organización de los bloques de genes conservados en miembros de diferentes subfamilias de herpesvirus.

Distribución prototipo del HHV-1 (Alphaherpesvirinae), HHV-5 (Betaherpesvirinae) y HHV-4 (Gammaherpesvirinae).

Representación de siete bloques de genes conservados que se identifican por sus números de ORF en la región UL del HHV-1.

Se muestran ejemplos de genes en cada bloque. UDG = uracil-DNA glicosilasa; gL, gM, gH = glicoproteínas L, M, H; h/p = subunidad del complejo helicasa-primasa; MCP = proteína principal de la cápside; RR = ribonucleótido reductasa. (Minson et al., 2000)

2.3.5 Genotipo del VHB-1

La genética molecular ha permitido la identificación de las variantes del ADN del VHB-1 determinándose genotipos distintos que se correlacionan con cada uno de los sistemas que afectan; así tenemos: un genotipo respiratorio, un genotipo genital, y un genotipo encefalítico, designados como VHB-1.1, VHB-1.2, y VHB-1.3, respectivamente. El VHB-1.3 se ha denominado recientemente VHB-5 (Rebhun, 1999).

Las diferencias antigénicas entre las cepas víricas pueden justificar los diferentes patrones de comportamiento epidemiológico y patológico de estos herpesvirus (Radostis et al., 2002)

2.3.6 Glicoproteínas de la envoltura

En la envoltura del BoHV-1 se hallan 11 glicoproteínas víricas: gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM y gN (Schwyzer & Ackermann, 1996; Liang et al., 1993; Liang et al., 1996). Cada una de ellas se nombra según su homóloga en el virión del HHV-1 (18th International Herpesvirus Workshop, Pittsburgh, 1993).

Las proteínas no estructurales están involucradas en el metabolismo del ácido nucleico (timidina quinasa, sintetasa, dUTPasa, ribonucleótido reductasa), la síntesis de ADN (ADN polimerasa, helicasa, primasa) y el procesamiento proteico (proteína quinasa, entre otras) (Murphy y col., 1999).

Entre las proteínas estructurales al menos 11 son glicoproteínas: gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM, y gN presentes en la envoltura viral formando proyecciones y juegan un rol importante en las interacciones virus-célula, como adherencia, penetración, difusión célula-célula y salida (Okazaki et al., 2005).

2.3.7 Glicoproteína I (gl)

La gl del BoHV-1 es una proteína de 61.5 kDa, producto del gen US7 que codifica para una secuencia de 382 aa (Leung-Tack et al., 1994). La gl del BoHV-1 se procesan a partir de precursores N-glicosilados, y quizás también O-glicosilados, de 84 y 39.5 kDa, respectivamente (Whitbeck et al., 1996; Yoshitake et al., 1997).

Estos precursores se unen entre sí no covalentemente por sus respectivos dominios extracelulares y forman el complejo gl. Su maduración ocurre tras formarse el dímero y, a diferencia del resto de los alphaherpesvirus, parte de la gl sintetizada se proteoliza de modo que sólo su porción extracelular de 45 kDa permanece acompañada a la gE (Whitbeck et al., 1996). La gl es una glicoproteína no esencial, conservada entre los alphaherpesvirus e implicada en la transmisión célula-a-célula' del virus (Yoshitake et al., 1997).

2.4 Replicación viral

La replicación de HVB-1 ocurre en células epiteliales del tracto tanto respiratorio como reproductivo y se inicia a las dos horas postinfección. El genoma de los herpesvirus solo codifica proteínas que son esenciales en la replicación viral, el resto de los materiales son adquiridos de la célula hospedera (Murphy y col., 1999).

El ADN sintetizado se ensambla en las cápsidas y el virus adquiere la envoltura a medida que gema por la membrana nuclear. El virión maduro se acumula en vacuolas en el citoplasma y es liberado por exocitosis o citolisis o puede pasar de una célula a otra a través de los puentes intercelulares (Mettenleiter, 2004).

2.4.1 Ciclo de Replicación Viral

Diversos estudios han demostrado que las diferentes glicoproteínas virales (gB, gC, gD, gE, gH, gK y gL) son requeridas en el proceso de entrada del virus a la célula. Los HVB-1.1 y HVB-1.2 difieren en algunos epítopes de la gC; dichos cambios pueden alterar la adhesión viral y pueden ocasionar diferencias en la virulencia del subtipo viral (Rijsewijk *et al.*, 1999).

Aunque la totalidad de las moléculas involucradas en la entrada del HVB-1 a la célula no están completamente dilucidadas, está claramente establecido que el virus se une a las moléculas de heparán sulfato presentes en la membrana celular) a través de las glicoproteínas virales gB y gC (Murphy y col., 1999).

Luego de esta unión inicial, las gB y gD se unen con alta afinidad a los receptores de la membrana celular (Murphy y col., 1999). Estudios más recientes para identificar estos receptores de alta afinidad, han mostrado que la gD de HVB-1 puede unirse débilmente con el HveC (receptor 1 de nectina) o con el receptor humano para el poliovirus (PVR) expresados en células de humano o de hámster (Mettenleiter, 2004).

2.5 Patogenia

El virus ataca primero las mucosas de la cabeza, luego la tráquea y pulmones, no siendo raro que después de una fase de viremia ocasione inflamación del sistema nervioso central y abortos en las vacas gestantes. La inflamación edematosa de las mucosas, que mas tarde pueden transformarse en necrosis, especialmente después del asiento bacteriano secundario, motiva una secreción al principio se da muy serosa o mucosa y luego mucopurulenta (flujo nasal, lagrimal, salivación abundante).

Los exudados fibrinosos provocan la aparición de revestimientos pseudomembranosos en las mucosas nasales, laringe y tráquea. En los pulmones se instaura una bronconeumonía catarral que puede ser supurativa si además participan, bacterias, que posiblemente obedecen a la actuación de un virus de acompañamiento (Schulz, 1993).

Después de la infección por vía respiratoria, el virus se replica en los linfonodos linfáticos regionales; de ahí por vía sanguínea, se localiza en el tracto respiratorio alto, produciendo la enfermedad respiratoria (INTA, 2002). La conjuntivitis en el proceso respiratorio se produce mediante aerosoles (Fener, 1992).

Siendo la propagación desde las cavidades nasales hacia los tejidos oculares, probablemente, a través de los conductos lagrimales (Blood, 1992). La encefalitis parece ser el resultado de la difusión neural directa a partir de la cavidad nasal, faringe y tonsilas a través de las ramas maxilar y mandibular del nervio trigémino y ganglio trigémino (Blood, 1992)

La invasión sistémica por el virus va seguida de la localización de este en varios tejidos diferentes. El virus puede ser transportado por leucocitos periféricos hacia la placenta, y se transfiere al feto causando aborto (Blood, 1992).

El proceso genital puede ser el resultado del coito o de la inseminación artificial aunque en algunos brotes, especialmente en vacas lecheras, puede no estar relacionado con el coito (Fenerr, 1992).

2.5.1 Signos y lesiones

Los signos clínicos de la forma respiratoria de la RIB incluyen: fiebre elevada de 40.5 a 42.2 °C; abatimiento, anorexia, respiración rápida (de 40 a 80 respiraciones/ min), secreción nasal serosa abundante que se convierte en secreción mucopurulenta espesa en las primeras 72 horas de la infección; tos dolorosa; formación de una costra necrótica en el hocico; placas blancas visibles en la mucosa nasal, en la mucosa del tabique nasal y, a veces, en las ventanas externas de la nariz y en el hocico; a veces ulceración de la mucosas del hocico y de la oral; estertores traqueobronquiales debidos al exudado mucopurulento o a las membranas diftéricas existentes en la laringe y en la tráquea; también se informa de ruidos y estertores en las vías respiratorias superiores sobre ambos campos pulmonares especialmente en la zona de los bronquios principales.

Aunque en ocasiones han sido observadas bronquitis y bronquiolitis, la mayoría de los casos no tienen patología pulmonar, a no ser que exista una bronconeumonía bacteriana secundaria.

La bronconeumonía bacteriana generalmente aparece en un plazo de 7 a 10 días después de la infección aguda de RIB, en los casos en que las bacterias complican la in mortalidad asoladora en los animales estresados, transportados o comprados recientemente que manifiestan síntomas de la infección de RIB concomitante con la infección por el virus de la DVB, con la infección por el VSRB, o con la bronconeumonía por cepas extraordinariamente patógenas de *Pasteurella haemolytica*. En brotes que aparecen en rebaños de animales adultos, parece que la enfermedad causa los signos más graves en las novillas de primer parto y puede afectar gravemente la producción futura de leche durante el resto de la primera lactación.

Los animales afectados manifiestan signos durante un período de 7 a 14 días y después de este tiempo curan, a no ser que exista una infección secundaria. Durante la infección aguda o en las 4 a 8 semanas siguientes puede haber abortos. Aunque puede existir mortalidad de fetos en cualquier fase de la gestación, la mayoría de los abortos aparece en el segundo o tercer trimestre de la preñez. La infección fetal directa o el estrés y la fiebre elevada pueden coadyuvar en los abortos.

La forma conjuntival a veces coexiste con la forma respiratoria y se caracteriza por inflamación intensa de la conjuntiva y secreción ocular serosa unilateral o bilateral que se vuelve mucopurulenta en un plazo de 2 a 4 días, además, en la conjuntiva palpebral se pueden ver a simple vista placas multifocales de color blanco formadas por linfocitos y células plasmáticas (Gomez 2008).

2.6 Diagnóstico

La confirmación de laboratorio es posible mediante la técnica de anticuerpos fluorescentes durante la fase aguda de la enfermedad (las lesiones más apropiadas son las de menos de 7 días). Los raspados de las lesiones de la mucosa y de las placas de color blanco deben ser positivos en la mayoría de los casos agudos. Además, durante este tiempo es posible el aislamiento del virus (Rebhun, 1995).

El diagnóstico incluye: serología solicitada por seroneutralización en cultivos celulares o a la prueba de ELISA (INTA, 2002). Estas pruebas se procesan con las muestras de sueros pares (sueros obtenidos de la fase aguda de la enfermedad y sueros del animal convaleciente obtenidos de 14 a 21 días después). Un incremento al cuádruple del título se considera positivo (Mohanty, 1983; Rebhun, 1999).

En ELISA el anticuerpo (o antígeno) se fija a una superficie, ya sea en contenedor de una placa de microtitulación o una partícula de plástico. El espécimen a prueba se aplica y el material adherido se detecta y caracteriza a través de un anticuerpo secundario marcado enzimáticamente. Estos ensayos son rápidos sencillos y fáciles de adaptar a analizadores automáticos, pero requieren de reactivos muy purificados (Parslow y col.2002).

Existen distintas variedades de ELISA pero las más utilizadas y sensibles es el análisis tipo Sándwich o indirecto. Un anticuerpo marcado con enzimas (mAb) dirigido contra un antígeno específico se fija a placas de microtitulación. Los contenedores se incuban con diluciones seriadas del espécimen del paciente para permitir la adherencia del antígeno al anticuerpo de superficie, posteriormente se lavan los contenedores.

El antígeno adherido se detecta mediante un anticuerpo secundario marcado enzimáticamente. Después de otro lavado, los contenedores se incuban con un sustrato de enzimas y se cuantifica la reacción enzimática (aparición del producto de la reacción) (Parslow y col.2002).

2.6.1 Técnica de ELISA

El acrónimo ELISA representa: E = Enzima, L= Linked (enlace), I = Inmuno , S = Sorbente , A= Assay

Valora anticuerpos específicos según el antígeno que se emplee, produciéndose una reacción antígeno- anticuerpo. Al final de la reacción se obtiene una solución de color que se mide con un espectrofotómetro, cuya intensidad está en la relación directa con la cantidad de anticuerpos (Ángel y Ángel, 2000).

En ELISA el anticuerpo (o antígeno) se fija a una superficie, ya sea en contenedor de una placa de microtitulación o una partícula de plástico. El espécimen a prueba se aplica y el material adherido se detecta y caracteriza a través de un anticuerpo secundario marcado enzimáticamente. Estos ensayos son rápidos sencillos y fáciles de adaptar a analizadores automáticos, pero requieren de reactivos muy purificados (Parslow y col. 2002).

Existen distintas variedades de ELISA pero las más utilizadas y sensibles es el análisis tipo Sándwich o indirecto. Un anticuerpo marcado con enzimas (mAb) dirigido contra un antígeno específico se fija a placas de microtitulación.

Los contenedores se incuban con diluciones seriadas del espécimen del paciente para permitir la adherencia del antígeno al anticuerpo de superficie, posteriormente se lavan los contenedores. El antígeno adherido se detecta mediante un anticuerpo secundario marcado enzimáticamente. Después de otro lavado, los contenedores se incuban con un sustrato de enzimas y se cuantifica la reacción enzimática (Parslow y col. 2002).

2.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR fue formulada por Kerry Mullis en 1985. Es un método rápido, *in vitro*, capaz de amplificar de forma enzimática un segmento específico de ADN de hasta 6 kb en cientos de miles y millones de veces (Voet y Voet, 2004).

En la última década se han descrito varios métodos para demostrar la presencia del ADN del BoHV-1 en muestras clínicas, incluyendo la hibridación ADN-ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La utilización de la PCR en el diagnóstico rutinario está creciendo (Torres, 1997; Manual de la OIE, 2004).

En comparación con el aislamiento de virus, la cadena de reacción polimerasa (PCR) tiene la ventaja principal de que es más sensible y más rápida: puede realizarse en 1–2 días.

También puede detectar ADN en ganglios sensoriales con infección latente. La desventaja es que es fácil de contaminar y por consiguiente, hay que tomar medidas para evitar falsos resultados positivos. El riesgo de contaminación disminuye notablemente con las nuevas técnicas de la PCR, como la denominada PCR en tiempo real o cuantitativo (Torres, 1997; Manual de la OIE, 2004).

El segmento de ADN que sirve de molde no requiere estar necesariamente en estado puro (Satz y Kornblihtt, 1993). La sensibilidad analítica es alta, con un número mínimo de 100 a 1000 copias del ADN diana detectable (Rodríguez y Barrera, 2004). La especificidad analítica puede ser también alta, depende de la selección del blanco, del diseño de los cebadores y la optimización del ensayo (Rola y col., 2005).

Entre otras ventajas de la técnica de PCR se encuentran que puede ser usada en una amplia variedad de muestras como tejidos, secreciones, fluidos corporales y materiales de cultivo de tejidos que contienen partículas viables y no viables. Además, es rápida, pues los resultados se obtienen en pocas horas, es reproducible, menos laboriosa y más económica que la técnica de hibridación de ácidos nucleídos (Leary y col., 1992).

Este es el ensayo molecular de mayor variedad y aplicación en el diagnóstico veterinario (Moore y col., 2000). También puede ser usado en la genotipificación, en los análisis filogenéticos de patógenos veterinarios (Schmitt y Henderson, 2005) y para detectar animales infectados latentemente (Yason y col., 1995; Deka y col., 2005).

Sin embargo, es propenso a la contaminación y por tanto deben tomarse precauciones para prevenir resultados falsos-positivos (Manual de la OIE, 2004a). En el procedimiento convencional de PCR (PCR simple), ocurren varios ciclos de amplificación, de 20 a 40. En cada uno, las dos cadenas de ADN son separadas por desnaturalización a elevada temperatura, ésta es entonces disminuida para lograr la hibridación de los cebadores a sus secuencias complementarias.

Luego la ADN polimerasa, a la temperatura de extensión y dirigida por los cebadores, sintetiza la nueva cadena de ADN complementaria a la secuencia diana. Finalmente, se obtiene una cantidad de ADN que resulta suficiente para operaciones posteriores tales como la detección, el clonaje o la secuenciación (Voet y Voet, 2004). Este método de PCR ha sido modificado de diversas maneras según Manual de la OIE, 2004, y se han obtenido diferentes tipos de PCR con sus correspondientes protocolos y ventajas según la situación.

Entre los más usados se encuentran el PCR anidado (del Inglés, Nested PCR) que emplea dos parejas de cebadores en dos rondas sucesivas del ensayo de PCR, la segunda pareja amplifica una secuencia diana en el producto de amplificación de la primera ronda, el PCR Múltiple (del Inglés, Multiplex PCR) que utiliza varios cebadores dirigidos a blancos diferentes y el PCR de la transcripción reversa (de sus siglas en Inglés, RT-PCR), que se emplea para amplificar, aislar o identificar una secuencia de ARN (Voet y Voet, 2004).

Hasta la fecha la PCR se ha utilizado principalmente para detectar ADN del BoHV-1 en muestras de semen infectado artificial o naturalmente. Los investigadores destacan que es importante optimizar cuidadosamente las condiciones de la prueba PCR, incluyendo la preparación de las muestras, la concentración de Mg²⁺, los cebadores y la polimerasa Taq, y los programas de ciclos.

La región a amplificar debe estar presente en todas las cepas del BoHV-1 y la secuencia nucleotídica debe estar conservada. Se han utilizado los genes TK, gB, gC, gD y gE como dianas para la amplificación mediante la PCR. (Manual de la OIE, 2004).

Para diferenciar entre un virus de campo y las cepas vacunales con el gen gE suprimido, se pueden utilizar las PCR basadas en la detección de las secuencias de gE. Con la técnica de la PCR no es posible discriminar entre la infección con cepas IBR virulentas y la infección con otras cepas vivas atenuadas.

Se han desarrollado pruebas PCR que distinguen entre el BoHV-1 y el BoHV-5. Experimentalmente, la PCR resulta más sensible que el aislamiento del virus: en muestras de semen obtenido a partir de toros infectados y diluido en yema de huevo, se detectó con la PCR un número de muestras positivas cinco veces mayor que con el aislamiento del virus.

Además, la PCR tiene un límite de detección de tan solo tres moléculas. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de falsos resultados negativos. Para identificar los posibles resultados negativos falsos, se recomienda introducir un ADN molde de control interno en el tubo de reacción de la muestra del semen, que se amplifique con los mismos cebadores. Tal ADN molde de control se puede construir insertando, por ejemplo, un fragmento de 100 pares de bases en la región analizada (Voet y Voet, 2004).

Este molde de control también hace posible semicuantificar la cantidad de ADN detectada. Cuando se está utilizando un control interno, es necesaria una prueba extensa para garantizar que la amplificación por PCR del control interno añadido

no compite con el diagnóstico de la PCR y por lo tanto, disminuye la sensibilidad analítica (Manual de la OIE, 2004).

Los aspectos fundamentales de los pasos que conducen a la amplificación de ADN en un paso a paso e introducir términos y algunos aspectos prácticos se pueden resumir como:

1. *Desnaturalización:*

Cuando una molécula de doble cadena de ADN (dcADN) se calienta a 95°C, las hebras se separan (desnaturalizan). Esto permite el acceso a los iniciadores de cadena sencilla de ADN (csADN).

2. *Templado:*

La mezcla obtenida en la reacción se enfría (unos 50°C) para permitir que los iniciadores seleccionen y se unan (hibridación) a sus posiciones complementarias en las moléculas de ADN de cadena simple.

3. *Elongación:*

La solución de csADN o iniciadores se calientan a 72°C. En presencia de la polimerasa termoestable, buffer de PCR, dNTP y moléculas de magnesio (Mg^{2+}), se inicia el procedimiento de replicación.

Con cada repetición de este ciclo, el objetivo es doble y muy pronto, después de 30 ciclos, las reacciones producirán más de 1 millón de copias del fragmento de ADN objetivo (Viljoen y cols. 2005).

Recientemente el PCR ha sido ampliamente utilizado para diferenciar entre las cepas vacúnales y cepas oncogénicas. Los métodos cuantitativos de PCR también se han desarrollado para la estimación precisa de la cantidad de copias del genoma en diversos tejidos (Pattison, et al. 2008).

Se ha desarrollado el siguiente método para la prueba de la PCR en tiempo real para detectar el BoHV-1 en una extensión de semen bovino destinado al comercio internacional. Se ha validado el método tal como se describió en los capítulos 1.1.4 y 1.1.5, lo que implica una comparación internacional exhaustiva entre los diversos laboratorios especializados en aplicar pruebas para la RBI.

En varios estudios se ha puesto de manifiesto que las pruebas de la PCR son más sensibles que el aislamiento del virus. Se ha utilizado la PCR en tiempo real para la detección de BoHV-1 y BoHV-5 en ganado y ratones infectados de forma experimental y se han utilizado varias pruebas de la PCR convencional para la detección del ADN del BoHV-1 en muestras de semen bovino infectado de forma natural o artificial. La detección convencional de los productos de la PCR se basa en el análisis mediante electroforesis en gel.

Se han seleccionado cebadores específicos de secuencia para amplificar las diferentes partes del gen conservado de la glicoproteína del genoma del BHV-1, que incluye el gen de la glicoproteína B (gB) el gen gC, el gen gD, el gen gE, y el gen de la timidina quinasa (tk). La PCR en tiempo real se diferencia de la PCR estándar en que los productos de la PCR amplificados se detectan directamente durante el ciclo de la amplificación utilizando una sonda de hibridación, lo que mejora la especificidad de la prueba.

Las pruebas de la PCR en tiempo real tienen varias ventajas sobre las pruebas de la PCR convencional. Las pruebas de la PCR en tiempo real en las que solo se utiliza un par de cebadores son capaces de proporcionar una sensibilidad casi igual o igual que las pruebas de la PCR anidada, con un riesgo de contaminación mucho menor.

La amplificación y la detección de la diana se realizan de forma simultánea. No hay que manipular el producto de la PCR tras la amplificación, lo que reduce de forma significativa el riesgo de contaminación, y permite realizar análisis cuantitativos con sistemas de PCR en tiempo real (Torres, 1997; Manual de la OIE, 2004).

Cabe mencionar que la PCR es un sistema muy sensible (Davison, 2004), Kròl y colaboradores calculan la sensibilidad en 85.9% y la especificidad en 100% en el diagnóstico de la EM (Kròl, et al. 2009), por lo tanto, todo tipo de precauciones se deben tomar para evitar la contaminación cruzada.

Las buenas prácticas de laboratorio son esenciales en todas las etapas del proceso, comenzando con la recolección de materiales, el aislamiento de ADN y, finalmente, la ejecución de la propia PCR.

La limitación más importante es que se tiene que conocer la secuencia de por lo menos parte del fragmento que va a ser purificado (Brown, 2008), aunque ya está disponible la secuencia de nucleótidos de diferentes genes de los tres serotipos del VEM (Saif, 2008) se recomienda el uso de programas informáticos para el diseño del iniciador, por lo que los iniciadores apropiados se pueden identificar con respecto a la secuencia de ADN que se amplifica (Voet y Voet, 2004).

2.6.2.1 ADN diana

En principio puede efectuarse la amplificación por PCR si está presente al menos un ejemplar intacto del gen diana. Si el número de ejemplares del gen diana es mayor, también lo será la probabilidad de que tenga éxito la amplificación del ADN. Cualquier alteración, como una muesca en el ADN diana, puede bloquear la amplificación por PCR (Voet y Voet, 2004).

El tamaño de la secuencia diana puede variar entre $< 0,1$ y unas cuantas kilobases. La cantidad total de ADN utilizada normalmente para la PCR está entre $0,05$ y $1,0 \mu\text{g}$, lo que permite la detección de ejemplares solos de la secuencia diana. Aunque las muestras no tienen que estar muy purificadas, sí es necesario eliminar algunos contaminantes, como la heparina, el formol, los agentes quelantes de Mg^{2+} o los detergentes, para evitar que inhiban el proceso de amplificación (Voet y Voet, 2004).

2.6.2.2 Diseño del Cebadores

Generalmente se utilizan cebadores de 16 a 30 nucleótidos de longitud, lo que permite que la temperatura de anillamiento sea razonablemente elevada. Los cebadores no deben tener tramos de secuencias con una polibase (p. ej., poli-dG) ni motivos repetidos, ya que podrían hibridarse de forma inadecuada con el ADN molde. Deben evitarse las secuencias repetidas invertidas, a fin de prevenir la formación de estructuras secundarias del cebador, que impedirían su hibridación con el ADN molde.

También deben evitarse las secuencias complementarias de otros cebadores utilizados en la PCR, para prevenir la hibridación entre cebadores o la formación de dímeros de cebadores (esto es especialmente importante en relación con el extremo 3' del cebador). Siempre que sea posible, conviene que el extremo 3' del cebador tenga gran proporción de bases G y C para aumentar la hibridación del extremo que se quiere extender. (Dieffenbach et al., 1995).

Es posible que el parámetro más crítico para tener éxito con la PCR sea el diseño de los cebadores. A igualdad de todos los demás factores, un cebador mal diseñado puede hacer que fracase una PCR. La secuencia del cebador determina varios aspectos, como la posición y la longitud del producto, su temperatura de fusión y finalmente el rendimiento (Innis y Gelfand, 1994). Un cebador mal

diseñado puede hacer que se consiga poco producto o incluso ninguno, debido a una amplificación inespecífica o a la formación de dímeros de cebador, lo que puede llegar a competir con la formación de producto hasta suprimirla. El objetivo de la presente nota de aplicación es dar normas que deben seguirse en el diseño de cebadores para la PCR. En otras publicaciones puede encontrarse un tratamiento más completo de este tema (Dieffenbach et al., 1995).

Al diseñar cebadores para PCR hay que tener en cuenta diversas variables. Entre ellas cabe destacar:

- Longitud del cebador
- La temperatura de fusión (T_f);
- La especificidad
- Las secuencias complementarias del cebador
- El contenido de G/C y los tramos de polipirimidina (T, C) o polipurina (A, G)
- La secuencia del extremo 3'.

2.6.3 Electroforesis Convencional en gel de Agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es de las más utilizadas para analizar y caracterizar ácidos nucleicos de distintas procedencias. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de ADN de diferente tamaño van a emigrar de forma distinta en una electroforesis en gel de agarosa.

Además, si en dicha electroforesis se aplican marcadores de peso molecular (fragmentos de ADN de tamaño conocido) se puede calcular el tamaño aproximado del ADN en estudio (Padilla *et al.*, 2003).

Se trata de una técnica sencilla y rápida que permite diferenciar fragmentos de ADN que no pueden separarse adecuadamente con otros procedimientos. Por otra parte, el ADN puede localizarse en el gel tiñendo con una concentración baja de bromuro de etidio, que es un agente intercalante fluorescente que se utiliza como colorante (Padilla *et al.*, 2003).

2.7 Prevención y Control

Entre las principales consideraciones que se deben de tener para el control del IBR que los animales infectados transportan al virus de por vida, ya que el VHB-1 permanece integrado por un período indefinido en células preferenciales. Es necesario definir la decisión de controlar la enfermedad clínica o eliminar la infección (Pidone *et al.*, 1999).

2.8 Medidas Sanitarias

Se basa en las medidas sanitarias elementales por parte del ganadero, como las de no introducir en la explotación animales seropositivos, no sacar y volver a meter animales sin previa comprobación de que son seronegativos, no prestar animales, no compartir pasturas, aplicar estado de cuarentena de 2 a 3 semanas a los animales recién ingresados, etc. En cuanto a las medidas de manejo es muy importante separar los animales en producción de los animales de reposición con el fin de evitar el contagio (Sánchez J., 1999; OIE, 2004).

2.9 Vacunas y plan de vacunación

Las vacunas vivas pueden aplicarse a partir de las 2 semanas de edad y las vacunas inactivadas a partir del tercer mes de vida. Si se vacuna con productos inactivados a bovinos menores de tres meses de vida, ya que la inmunidad puede verse afectada por existencia de anticuerpos maternos. La revacunación se realiza por lo común con intervalos de medio a un año (Brunner, 2002).

Existen dos tipos de vacunas elaboradas con virus vivo modificado disponible. Una es de uso intramuscular, elaborada por lo general, con cultivos tisulares de riñón bovino y la otra es una vacuna intranasal elaborada con tejido tisular de conejo. También se dispone de vacunas intranasales de cultivos celulares de bovino que contiene un mutante sensible a la temperatura.

2.9.1 Vacunas convencionales

Se basan en la eficacia de la inmunización activa después de la exposición natural, y se emplean vacunas a virus vivos modificados y vacunas a virus inactivados.

2.9.2 Vacunas a virus vivos modificados.

Se usan tanto vía parenteral como nasal, induciendo una respuesta inmunitaria rápida, local y de relativa larga duración. En casos de vacas gestantes la vía parenteral no debe ser usada porque induce al aborto (Radostis et al., 2002).

2.9.3 Vacunas a virus inactivados.

Estas no inducen abortos, inmunosupresión o latencia aunque no previene la fase de latencia de las cepas de campo, y recién se alcanza niveles adecuados de protección, de 7 a 10 días, a partir de la segunda dosis que se administra a los 10 a 14 días de la primera. (Radostis et al., 2002).

2.9.4 Vacunas marcadas

Se basan en la mutación por selección de una o más proteínas víricas; las más usadas son por la mutación de la gE y de la sub unidad de la gD; lo que permite al sistema inmune la síntesis de determinados anticuerpos vacúnales y que a través de pruebas diagnósticas permite detectar animales vacunados de animales infectados por virus de campo.

Ambos tipos de vacunas han demostrado la reducción de la severidad de signos clínicos y de la re excreción del virus. Una de sus desventajas es el problema concerniente al establecimiento de latencia por la vacuna, pero se vienen empleando en programas de erradicación de la enfermedad (SCAHAW, 2000)

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Localización del sitio experimental

En el presente trabajo el muestreo se realizó en el municipio de Quiriego, Sonora, México, ubicado en la zona sur del estado de Sonora kilómetro 21 en la transición entre la Sierra Madre Occidental y la Llanura Costera del Pacífico en las coordenadas geográficas Latitud 27° 31' N, Longitud 109° 15' O Altitud 822, y se corrieron las pruebas en el Laboratorio de Biología molecular localizado en Cd. Obregón, en el Instituto Tecnológico de Sonora.

Las coordenadas son 27⁰29' latitud norte y 109⁰59 longitud oeste. Con una altitud sobre el nivel del mar de 40 metros. La temperatura promedio en los meses de junio, julio y agosto (verano) va de los 24 °C mínima y 44.5 °C máxima. Gran parte de la precipitación pluvial en los meses de junio, julio y agosto es de 9.4 a 133.8 mm en promedio (INEGI, 2011).

3.2 Clasificación del estudio

Se clasifica como un estudio de tipo observacional, descriptivo (Dawson, 1993) y también mencionada por (Estéves, et al. 2008)

3.3 Material

3.3.1 Material biológico

Se llevó a cabo un muestreo en bovinos de diferentes razas, sexo y edad, extrayendo sangre de de la vena caudal utilizando jeringas de 5ml. Una vez colectada la sangre de dicha muestra se depositó en tubos de ensayo sin anticoagulante, retirando la aguja de la jeringa al momento de vaciarla, esto se hizo para evitar turbulencia y por consiguiente la hemólisis de la muestra.

Posteriormente, las muestras fueron refrigeradas prosiguieron se trasladaron al laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinaria del Instituto Tecnológico de Sonora, Se centrifugaron las muestras para la extracción del suero y se congelaron, para la realización de la prueba de ELISA, prosiguiendo después con la extracción del suero. Y por ultimo correr la técnica de Cadena de Reacción Polimerasa (PCR).

3.3.2 Prueba de ELISA

Se realizó la prueba de inmunoserología utilizando una ELISA de inmunomigración (ImmunoComb. BIOGAL GALED LABS), la cual detectó títulos de anticuerpos para IBR.

3.4 Metodología

En el rancho sacrificio de cabora se realizo un muestreo sanguíneo al azar a 30 animales, fueron recolectadas por medio de jeringas de 5 ml de la arteria o vena coccígea del ganado, la muestra se colocaron en tubos para sangre sin anticoagulante.

Una vez recolectadas fueron colocadas en una hielera con refrigerante, y fueron llevadas al laboratorio de Biología Molecular para su inmediata centrifugación. Ya una vez centrifugadas las muestras, el suero se colocó en viales para su conservación en refrigeración o congelación.

Una vez extraído el suero se procedió a realizar la prueba serológica

1.- Después de haber recolectado sangre y obtener el suero, usar una micropipeta o un tubo capilar para recolectar 5 microlitros de suero.

2.- Apoyándote de unas pinzas, remover o perforar el protector de aluminio que cubre al pozo de la columna A de reacción de las tarjetas de Immunémbolo hasta el tope para depositar el suero completamente.

3.- Colocar 5 microlitros de control positivo y 5 microlitros de control negativo en las últimas dos casillas (si son menos de 10 muestras, tomar dos columnas para los controles, después de la última muestra).

4.- Remover el resto de la envoltura protectora de ImmunoComb y colocar las muestras. Mover suavemente el peine hacia arriba y hacia abajo durante varias veces, después dejar incubar por 10 min.

5.- Remover las envolturas del compartimiento B, mover suavemente el peine hacia arriba y hacia abajo durante varias veces, después dejar incubar por 2 min. Sacudir suavemente el exceso de líquido al cambiar de un compartimiento a otro.

6.- Remover las envolturas del compartimiento C, mover suavemente el peine hacia arriba y hacia abajo durante varias veces, después dejar incubar por 10 min.

7.- Remover las envolturas del compartimiento D, mover suavemente el peine hacia arriba y hacia abajo durante varias veces, después dejar incubar por 2 min.

8.- Remover las envolturas del compartimiento E, mover suavemente el peine hacia arriba y hacia abajo durante varias veces, después dejar incubar por 2 min.

9.- Remover las envolturas del compartimiento F, mover suavemente el peine hacia arriba y hacia abajo durante varias veces, después dejar incubar por 10 min. Regresar al compartimiento E y dejar incubar 2 min.

10.- Sacudir el exceso de líquido y dejar secar, para su posterior lectura de la intensidad de color con ayuda de una escala.

11.- Después de la realización del análisis de laboratorio (ELISA), se realizará el análisis e interpretación de los resultados obtenidos.

De los 30 de sueros que se muestrearon se eligieron al azar 10 para correr la prueba de Elisa, los que salieron serológicamente positivo fueron seleccionados 5 de ellos (los de mayor rango de titulación) para trabajar con más confianza las pruebas de PCR, ellos fueron: 6393, 7385, W39, 6383, 7605, con los que se procedió a la extracción de ADN.

3.4.2 Extracción de ADN en suero por medio del Kit QIAamp Minini Kit (QIAGEN)

La extracción del ADN, se adiciono 20 µl de proteinasa K en un vial de 1.5 ml . 200 µl de buffer AL ; agito en un vortex por 15 segundos , se incubo a 56°C durante 10 minutos ; se prosiguió adicionando 200 µl de etanol absoluto a la muestra y mezclar en vortex por 15 segundo , pasar la mezcla del paso anterior a la columna y se centrifugo a 8000 rpm durante 1 minuto , se pasó a la columna a un tubo colector nuevo y se adiciono 500 µl de buffer AW1 , centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto , pasando a la columna a un nuevo tubo colector y adicionándole 200 µl de buffer AE , se incubó durante 5 minutos a una temperatura ambiente y por último se centrifugo a 8000 por 1 minuto (Qiagen ,2010).

3.4.3 PCR

Los cebadores que se utilizaron fueron basados por el autor Deka y colaboradores en 2005 secuencia de la región del gen de la glicoproteína gl del BHV-1 con ello producir un producto de PCR de 468 de base. El primer iniciador fue 5'-CACGGACCTGGTGGACAAGAAG-3' secuenciado por 5'-CTACCGTCACGTGAGTGGTACG-3'.

Se procedió a preparar las reacciones de PCR, utilizando para su preparación 5 μL de ADN modelo, 15 μL de MasterMix, 2 μL de cada iniciador, y 3 μL H_2O libre de ARNasa. Utilizando diferentes temperaturas al termociclador para las reacciones de amplificación de acuerdo con el siguiente protocolo: Desnaturalización inicial de 95°C a 5 minutos (1 ciclo), desnaturalización 95°C por 30 segundos, alineamiento a 55° c por 2 minutos y extensión a 72° c por un minuto (a 35 ciclos), y una extensión final a 72°c por 5 minutos.

3.4.4 Electroforesis convencional en gel de agarosa

Se prepararon geles de agarosa (AXIGEN BIOSCIENCES AGAROSE LE 100 GR) al 1.6% utilizando y Buffer TAE 1X (Promega Corporation TAE) y 1 μg de bromuro de etidio como revelador. Para la carga de los pozos del gel de electroforesis se utilizaron 5 μL del producto de amplificación más 1 μL de azul de bromofenol para las muestras y los controles (positivo y negativo), utilizando como referencia un marcador molecular de 100 pb (DNA ladder, Invitrogen). Los geles se colocaron en cámara de electroforesis horizontal a 200v durante 15 minutos, y los resultados se observaron en un transluminador con luz UV (Hoeter Macrovue uv-25).

3.5 Variables a medir

Las variables a medir son la presencia o ausencia de la porción genómica del virus IBR por la prueba de PCR.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

Para la realización del objetivo planteado en este trabajo se realizaron 30 muestras de sangre donde se extrajeron suero de un hato sospechoso a IBR. De las muestras obtenidas, se tomaron 10 y se les realizó la prueba ELISA™. Se trabajo con 5 muestras serológicamente positivas donde se les hizo extracciones de ADN utilizado el kit comercial (QUIAGEN®).

4.1 Extraccion de ADN

El método utilizado para la extracción de ADN utilizado fue un kit comercial (QUIAGEN®). Una vez extraído el ADN por la metodología mencionada, se tomaron 5 μ L de ADN para mezclarlo los demás diluciones. En este trabajo no se cuantificó la cantidad de ADN extraído por el kit, ni su pureza y calidad del mismo.

4.2 Diseño de los cebadores

La secuencia específica de los cebadores (primers), fueron tomadas del GeneBank. Datos tomados de los resultados publicados por Deka *et al.* (2005). El amplicón esperado fue de alrededor de 468 pb del gen *gl*. La importancia del tamaño del amplicón reside en la necesidad de obtener un número suficiente de moléculas a amplificar en el extracto de ADN.

Estas secuencias específicas, han sido reportadas por diversos autores, coincidiendo con los resultados del presente trabajo y los de Deka *et al.* (2005), donde se trabajó con el mismo gen *gl*. Estos resultados también concuerdan con Rocha *et al.* (1998), que reportaron que amplificaron el gen a partir de tres fetos donde se maceraron los órganos riñón, pulmón, entre otros. Kataria (1997) extrajo el ADN en semen congelado, y utilizó la glicoproteína *gE*.

4.3 Condiciones sistema de amplificación del PCR

En este trabajo se estandarizó el protocolo para la amplificación de muestras de sueros positivos en la técnica de ELISA. Dichas muestras se trabajaron con secuencias de ADN específicas mediante PCR.

En el desarrollo de los sistemas de amplificación de ADN, es necesario una selección y diseño de los cebadores adecuados, así como la optimización de la composición de la mezcla de reacción y de los parámetros del termociclador (Ballin *et al.*, 2009; Bai *et al.* 2009).

Para la optimización de las condiciones de amplificación, se consideraron parámetros del termociclador como la temperatura y tiempo de las diferentes fases del mismo (desnaturalización, elongación e hibridación), así como la composición de la mezcla de la reacción (concentración de cloruro de magnesio, deoxinucleótidos, buffer de reacción, etc), que afectan a la eficiencia de

amplificación de secuencias de ADN por PCR, pero sin duda, la temperatura de hibridación es uno de los parámetros que mayor influencia tiene sobre la amplificación (Henegariu *et al.*, 1997).

4.4 Optimización de temperatura

Para la optimización de la temperatura, se consideraron las tres etapas de la técnica PCR que son desnaturalización, alineamiento y extensión. También se considero una temperatura de desnaturalización previa a estas etapas, con la finalidad de evitar en lo posible, la formación de estructuras secundarias y de otros tipos (dímeros).

Después de la optimización de las temperaturas, el procedimiento de PCR convencional, utiliza varios ciclos de amplificación, de 20 a 40. En cada uno, las dos cadenas de ADN son separadas por desnaturalización a elevada temperatura, ésta es entonces disminuida para lograr la hibridación de los cebadores a sus secuencias complementarias.

Luego la ADN polimerasa, a la temperatura de extensión y dirigida por los cebadores, sintetiza la nueva cadena de ADN complementaria a la secuencia diana. Finalmente, se obtiene una cantidad de ADN que resulta suficiente para operaciones posteriores tales como la detección, el clonaje o la secuenciación (Voet y Voet, 2004).

De los autores que trabajaron con estas temperaturas fueron Piedahita *et al.*, (2005). Que además implementaron una rápida, sensitiva y específica prueba de PCR Herpesvirus Bovino tipo 1, cuyos fragmentos fueron secuenciados, en la que utilizo tres glicoroteinas diferentes; gpB, gpD, y gpE. El amplicon resultante del gen gpB fue de 468 pb. Lo que coinciden con los resultados de este estudio.

Bandyopadhyay *et al.* (2009), realizaron amplificaciones de ADN por PCR con diferentes cebadores utilizando la glicoproteína gB y gE, utilizando las mismas temperaturas finales propuestas en este trabajo de investigación. Las muestras fueron tomadas de animales sospechosos extraídas con hisopos.

El hecho de que el genoma de los herpesvirus sea rico en Glicoproteína (32-75%), se tuvo en cuenta para el diseño de cebadores que permitieron usar un rango de temperaturas de alineamiento elevadas. Al evaluar las temperaturas 57, 60, 62 y 65°C se obtuvieron con la temperatura de alineamiento de 68°C, se obtuvo una banda de reducida intensidad comparada con el resto.

Esto se debe a que elevadas temperaturas disminuyen la sensibilidad de la reacción. Se seleccionó la temperatura desnaturalización inicial de 95°C a 5 minutos (1 ciclo), desnaturalización 95°C por 30 segundos, alineamiento a 55° c por 2 minutos y extensión a 72° c por un minuto (a 35 ciclos), y una extensión final a 72°c por 5 minutos. En la tabla 1.1 se muestra las condiciones finales óptimas de termociclado para la amplificación del gen GI.

Tabla 1.1 Condiciones óptimas de amplificación del ADN

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO	NUMERO DE CICLOS
DESNATURALIZACION INICIAL	95°C	5 MINUTOS	1 CICLO
DESNATURALIZACION	95°C	30 SEGUNDOS	
ALINEAMIENTO	55°C	2 MINUTOS	
EXTENSION	72°C	1 MINUTO	35 CICLOS
EXTENSION FINAL	72°C	5 MINUTOS	1 CICLO
CONSERVACION	4°C	INDEFINIDO	1 CICLO

En la tabla 1.2 se muestra los volúmenes y concentraciones finales de la reacción de PCR que empleamos como base para la estandarización fueron las basadas por (Voet y Voet, 2004).

Se busco la concentración ideal ya que se empezó con una dilución de 10 μL de Máster Mix, de cada cebador 1.5 μL , h2o 2 μL y de 4 μL ADN.

Los problemas que se tenían que no detectaba el ácido nucleído viral en las bandas y había problemas de dímeros, con ello se decidieron aumentar 1 μL más al ADN extraído y quedo en 5 μL de dilución final, en cuanto el Máster Mix se quedo a 15 μL , los dímeros se pusieron 2 μL y para evitar problemas de dímeros se puso de h2o 4 μL obteniendo con ello una concentración final de 27 μL .

Tabla 1.2 Concentraciones finales

Concepto	Cantidad
MASTER MIX	15 μL
PRIMER 2R	2 μL
PRIMER 2F	2 μL
H2O	4 μL
ADN	5 μL
Volumen Total	27 μL

4.5. Análisis de las muestras amplificadas por PCR.

Se logro amplificar la porción del gen gl de Herpervirus Bovino tipo I utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, los fragmentos obtenidos en el producto fue de 468 pb.

Los resultados obtenidos confirman la utilidad del ensayo de PCR para la identificación del virus y para descartar la presencia de este agente en el esquema de enfermedades de complejo respiratorio bovino y vesicular.

El amplicón que se obtuvo y se analizó en este trabajo con la prueba de electroforesis en el gel de agarosa se observó la migración de las muestras, obteniendo con ello un desplazamiento molecular, el cual se apreció en el transluminador de luz ultravioleta continuación en la Figura 1.2.

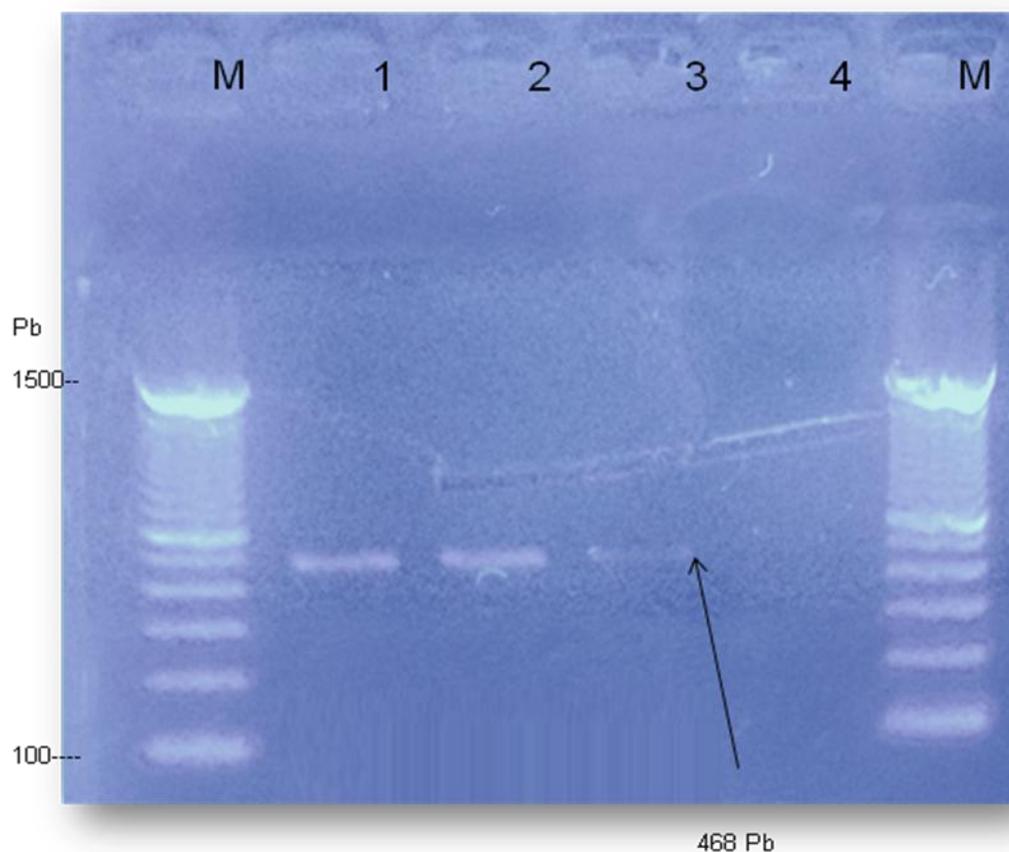


Figura 1.2, Gel de agarosa reacción final para PCR en buffer TAE.

Línea M son los marcadores de DNA ladder 100 pb, línea 1 y 2 muestra positiva a IBR por PCR, Las cuales marcan una banda aproximadamente de 468 pb los casuales representan los fragmentos del gen I, línea 3 control positivo, línea 4 control negativo.

Se cumplió el objetivo al estandarizar la prueba de PCR para el diagnóstico de la enfermedad de IBR, Los resultados obtenidos por Deka *et al.* (2005), en la amplificación del gen I en muestras extraídas de semen congelado utilizando los mismos iniciadores que la presente investigación coincide con lo amplificado en el cual al colocar los iniciadores estos tienen más oportunidades de reconocer una secuencia de 468 pb.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La técnica de PCR es más sensible, rápida, específica, menos laboriosa y más económica que la hibridación de ácidos nucleídos y que los métodos tradicionales de detección de este agente infeccioso.

La amplificación de la porción variable del gen gI del virus de rinotraqueitis infecciosa bovina fue un éxito y puede ser extraída satisfactoriamente en suero.

Hasta este momento, según la amplia revisión bibliográfica, no se ha reportado trabajos de la identificación del gen gI (IBR) extraída de muestras de suero sanguíneo.

Como recomendaciones, se debe de estar revisando en el hato que esté libre de este agente ya antes mencionado causa baja en lo que es la producción, problemas reproductivas y mortalidad en animales jóvenes , con ello una prueba muy eficiente es la técnica de PCR se puede aplicar para la detección IBR haciendo una muy buena extracción de ADN y cuidando de no contaminar , no utilizar mucho de cebador ya que hay más probabilidades que se tenga problemas de dímeros , también como otra recomendación apegarse a las temperatura que marcan los primer o cebadores.

Después de ver realizado la técnica de PCR detectando el gen gl, se recomienda el uso RFLP para poder detectar diferentes variables del virus que está en el hato. Esto se recomienda en animales que son nuevos en las explotaciones es por ellos , que se recomienda hacer una cuarentena donde se pueda monitorear los animales y ver que están libres de patógenos . Es importante el uso de la vacunación para prevenir y en caso de un animal enfermo empezar con el tratamiento

VI. BIBLIOGRAFÍA

Abul, K. 2002. Inmunología Celular. Interamericana MC GRAW HILL. Aravaca, Madrid. Pp.540.

Angel, G., Angel, M. 2000. Clínica del laboratorio Panamericana. Bogotá, Colombia. Pp. 174.

Bai W.B., Wentao XU., Kumlun H., Yanfag Y., Sishuo C. Y L. Yunbo. 2009. A novel common primer multiplex PCR (CP-M-PCR) method for the simultaneous detection of meat species. Food Control. Vol 20: 366-370

Ballin, N.Z., Vogenze, F.K., Karlsson, A.H., Species Determination. 2009. – Can we detect and quantify meat adulteration?, Meat Science, Vol 83: 165-174.

Bandyopadhyay S, Georjin JP, Schynts F, Vanderplasschen A, Thirty E. (2009). Bovine herpesvirus 1 glycoprotein D expression in bovine upper respiratory tract mediated by a human adenovirus type 5. *Vet Res.* 2004b;35:715-21.

Blood, D. Rodostits, O 1992. Libro de Texto de las Enfermedades del Ganado Vacuno, Ovino, Porcino, Caprino, y Equino. Vol II. Interamericana MC GRAW HILL. España pp.969

Blowey, R.1992. Atlas en color de Patología de Ganado Vacuno. Interamericana MC GRAW HILL. pp. 75-76.

Blowey, R. 2004. Diseases and Husbandry of cattle. Second edition. BLACK WELL SCIENCE. Australia. pp. 289-292

Brown, T. (2008). *Genomas* (3 ed.). Argentina: Médica Panamericana.

Brunne R.r, 2002. Vacunación de los animales domésticos. Acribia. Zaragoza, España. pp. 19-21.

Centro Nacional de Estudios Municipales, Gobierno del Estado de Sonora, Los Municipios de Sonora, Enciclopedia de los Municipios de México. Talleres Gráficos de la Nación, México, D.F. 1988.(Ver:<http://www.elocal.gob.mx/work/templates/enciclo/sonora/municipios/26056a.htm>)

Correa, P. 1988 Enfermedades Virales de los Animales Domésticos. Quinta Edición. Paradigmas. México, D.F. pp. 45

Dawson S.B., Trapp R.G. 1993 Bioestadística médica. Manual moderno. Mexico , D.F. pp.8

Delgado, I. D.; Barrera, M. V.; Rodríguez, N. B.; Sánchez, L. M.; Mendoza, S. E. y Ciprián, A. C. (2005). Utilización de estuches de diagnóstico de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa directas para la determinación de parainfluenza 3 bovina y herpesvirus bovino tipo 1 en Cuba. *Vet. Méx.* 36(3): 295-302.

Deka, D., N.K. Ramneek, N.K. Maiti and M.S. Oberoi. 2005. Detection of infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 23: 1085-1094.

Engels, M. y Ackermann, M. (1996): Patogénesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet. Microbiol.* 53: 3-15.

Engels, M.; Giuliani, C.; Wild, P.; Beck, T. M.; Loepfe, E. y Wyler, R. (1986): The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to know BHV-1 strains by restriction site mapping and crosshybridization. *Virus Research* 6: 57-73.

Engels, M.; Steck, F. y Wyler, R. (1981): Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 67(2): 169-174.

Estévez, J., Martínez, M and Seguí, M. (2008). *Epidemiología aplicada* (2 ed.). España: Ariel.

Gomez, R. G. (2008). *Enciclopedia Bovina*. Ciudad de Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México.

Fenner, F. 1992. *Virología Veterinaria*. Acribia. Zaragoza, España. pp.350- 361

Fauquet, C.M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; y Ball, L.A. (eds) (2005): *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV*. Elsevier, Academic Press. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fr-fst-g.htm>> Última actualización enero del 2005, consultado 28 de marzo de 2006.

Franco, Ana C. et al. (2002) Construction and characterization of a glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus type 1.2 strain isolated in Brazil. *Braz. J. Microbiology* vol.33.

Henegariu O. heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH , Vogt PH (1997) Multiplex PCR : critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques* 23:504-511

INTA, 2002. Rinotraqueítis infecciosa bovina. Boletín informativo del Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria. (Ver: <http://www.sia.net.ni/descargarcontenido.do?documento=21>).

INEGI. (2011, agosto). *INstituto nacional de estadística y geografía*. Retrieved septiembre 18, 2011, from <http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?ent=26>

Kaashoek, M. j., Rijsewijk, F. A. M and Van Oirschot, J.T. 1996. Persistence of antibodies against Bovine herpesvirus 1 and virus reactivation two to three years after infection. *Vet. Microbiol.*, 53: 103- 110.

Leary, T. P. y Splitter, G. A. (1992): Infectious bovine rhinotracheitis. In: Castro, A. E, Houschele, W. P., eds. *Veterinary Diagnostic Virology*. St. Louis: Mosby Year Book. 103-106.

Manual de la OIE (2004): Infectious bovine rhinotracheitis/ infectious pustular vulvovaginitis. Capítulo 2.3.5. In: Manual of Standards Diagnostic Tests and Vaccine 2004, 5ta edición, Office International des Epizooties.

Manual de la OIE (2004b): Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases. Capítulo. 1.1.4. In:

Manual of Standards Diagnostic Tests and Vaccine 2004, 5ta edición, Office International des Epizooties.

Martínez, M. M. (2007). *Clinica de los bovinos*. Mexico: Acribia S.A.

Marchant, I. 1980. Bacteriología y virología Veterinarias. 3^a edición. ACRIBIA. España. Pp. 645

Mettenleiter, T. C. (2004): Budding events in herpesvirus morphogenesis. *J. Virus Res.* 8(13).

Minson, A. C., Davison, A., Eberle, R., Desrosiers, R. C., Fleckenstein, B., McGeoch, D. J., Pellet, P. E., Roizman, B. & Studdert, D. M. J. (2000). Family *Herpesviridae*. In *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp.203-225. Edited by M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle & R. B. Wickner. San Diego: Academic Press.

Moore, S.; Gunn, M. y Walls, D. (2000): A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. *Vet. Microbiol.* 75: 145-153.

Mohanty, S. 1983. *Virología Veterinaria*. Interamericana S.A. DE C.V.México DF. Pp.114-118.

Murphy, F. A.; Gibbs, E. P. J.; Horzinek, M. C. y Studdert, M. J. (1999): *Veterinary Virology*, Third Edition.

Obando, C 1999. Bovine Viral Diarrhoea Virus in Venezuela cattle. Emphasis on diagnosis and concomitant infections with other viruses of the bovine respiratory disease complex. International Master of Science Programme Faculty of Veterinary Medicine. Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala. Pp.14.

Okasaki K.; S. Fujii; A. Takada; H. Kida. 2005. The amino-terminal residue of glycoprotein B is critical for neutralization of bovine herpesvirus 1. *Virus Research*. Art. Press. p. 7

Padilla Peña, Carmen Alicia., Díez Dapena, Jesús, Martínez Galisteo, Emilia., Bárcena Ruiz, José Antonio., García Alfonso, Concepcion. 2003. Electroforesis de Ácidos Nucleicos en geles de Agarosa. Aislamiento y Caracterización Electroforética de ADN plasmídico. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Córdoba, España. pp: 1-8.

Parslow, T. Stites, D., Terr A., Imboden, J. 2002, *Inmunología básica y clínica*. Manual moderno. México D.F. – Santa Fé de Bogotá

Piedrahita D, Ramirez G, Vera V. **Detección y caracterización por métodos moleculares de aislamientos colombianos de Herpesvirus bovino tipo 1.** (2005). *Rev Fac Med Vet Zoo*. 2005;52:122-127.

Pidone, C. L.; Galosi, C. M. y Etcheverrigaray, M. E. (1999): Herpesvirus bovinos 1 y 5. *Analecta Veterinaria* 19(112): 40-50.

Pelt, E., Belkum, A., & Hays, J. (2008). *Principles and technical aspects of PCR amplification*. Netherlands: Springer.

Qiagen .(2010). QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. [http:// www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=200373](http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=200373)

Radostits, O.; Bay, C.; Blood, D. Hinchcliff, K. 2002. Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del Ganado Bovino, Ovino, Porcino, Caprino y Equino. 9ª ed. Editorial MacGraw Hill Interamericana. Vol. II. Pags: 1390-1403.

Rebhun, W. 1995. Enfermedades del Ganado Vacuno Lechero. Acribia. Zaragoza, España. Pp. 112.

Rebhun, W. 1999. Enfermedades del Ganado Vacuno Lechero. Acribia. Zaragoza, España. Pp. 105-107.

Rijsewijk, F. A., Verschuren, S. B., Madic, J., Ruuls, R. C., Renaud, P. & van Oirschot, J. T. (1999). Spontaneous BHV1 recombinants in which the gl/gE/US9 region is replaced by a duplication/inversion of the US1.5/US2 region.

Rola, J.; Larska, M. y Polak, M. P. (2005): Detection of bovine herpesvirus 1 from an outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Bull Vet. Inst. Pulawy*. 49: 267-271.

Roizman, B., Pellett, P.E. (2001). The family *Herpesviridae*: a brief introduction. Chapter 71. In: DM Knipe, PM Howley, eds. *Fields' Virology*, Edition 4, Volume 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp 2381-2397.

Schulz, 1993. Tratado de enfermedades del ganado vacuno. Acribia. Zaragoza (España) pp. 179- 181.

Schmitt, B. y Henderson, L. (2005): Diagnostic tools for animal diseases. *Rev. sci.tech. Off. int. Epiz.* 24(1): 243:250.

Schynts, F., Meurens, F., Detry, B., Vanderplasschen, A., Thiry, E. (2003). Rise and survival of bovine herpesvirus 1 recombinants after primary infection and reactivation from latency. *Journal of Virology* 77: 12535-12542.

Schwyzler, M. & Ackermann, M. (1995). Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Veterinary Microbiology* página 53.

Torres, M. H. (1997): Diagnóstico de infecciones con técnicas de biología molecular. *Boletín de la Escuela de Medicina. Universidad Católica de Chile.* 26(3): 1-4.

Yason, C. V.; Harris, L. M.; McKenna, P. K.; Wadowska, D. y Kibenge, F. S. B. (1995). Establishment of Conditions for the Detection of Bovine Herpesvirus-1 by Polymerase Chain Reaction Using Primers in the Thymidine Kinase Region. *Can. J. Vet. Res.* 59: 94-101

Yoshitake, N., Xuan, X. & Otsuka, H. (1997). Identification and characterization of bovine herpesvirus-1 glycoproteins E and I. *J Gen Virol* 78, 1399–1403.

Voet, D. y Voet, J.G. (2004): *Biochemistry*, 3ra edición. John Wiley & Sons Inc. Chapter 5: Nucleic Acids, Gene Expression, and Recombinant DNA Technology. Pág: 80-126

Viljoen, G., Nel, L., & Crowther, J. (2005). *Molecular diagnostic PCR handbook*. Vienna: Springer.

Whitbeck, J. C., Knapp, A. C., Enquist, L. W., Lawrence, W. C. & Bello, L. J. (1996). Synthesis, processing, and oligomerization of bovine herpesvirus 1 gE and gI membrane proteins. *J Virol* 70, 7878–7884.