



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN
MOLECULAR DE *RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA*
EN GANADO REPRODUCTOR.

Autor

Patricio Alejandro Vega Mariño

Año
2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR
DE RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA EN GANADO REPRODUCTOR.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología

Profesora Guía
PhD. Alina Aguirre Quevedo

Autor
Patricio Alejandro Vega Mariño

Año
2017

DECLARACIÓN DEL DOCENTE GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Alina Aguirre Quevedo
Doctora en Ciencias Biológicas
CI: 175659460-0

DECLARACIÓN DEL DOCENTE CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Fernando Xavier Rivas Romero

Master Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

CI: 171809270-1

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTIFICO

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

Dra. Maritza Barrera Valle, PhD
Doctora en Ciencias Veterinarias
CI: 175673601-1

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Patricio Alejandro Vega Mariño

CI: 172224746-5

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro-AGROCALIDAD por haberme permitido realizar este trabajo de investigación. Especialmente a la PhD. Maritza Barrera Valle por transmitir sus vastos conocimientos y a las MVZ María Elena Robalino y Paola Revelo por su apoyo y consejo durante la realización de esta tesis. A demás, quiero agradecer a todos los profesionales, pasantes y tesistas que forman parte del laboratorio de diagnóstico animal en esta distinguida institución gubernamental.

Agradezco de manera especial a mí amiga, enamorada, futura novia y esposa Cynthia Tovar por todo el amor, paciencia y apoyo brindado durante todo este tiempo de conocernos.

DEDICATORIA

El presente proyecto de investigación está dedicado a la memoria de quienes ya no se encuentran presentes hoy pero de los cuales sus recuerdos perduran y son la guía de cada una de mis acciones, a mis abuelitos Eliseo Mariño y Benigno Vega por enseñarme que con esfuerzo y dedicación puedo conseguir todo lo que me proponga.

A mis abuelitas Rosita Sevilla y Blanca Carrillo por todo sus consejos, amor y apoyo durante toda mi vida.

A mis padres Carmita Mariño y Juan Vega que ni con todas las palabras de mundo puedo expresar el agradecimiento y amor incondicional que me han brindado.

A mi hermano, tíos, primos y demás familia por su cariño y apoyo.

RESUMEN

La Rinotraqueitis infecciosa bovina es una enfermedad causada por el Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1). Esta ocasiona grandes pérdidas económicas en el sector Agropecuario constituyendo un grave problema a nivel mundial tanto en el ganado de carne como en el lechero. La enfermedad se presenta de tres formas principales: la forma reproductiva o genital con el aumento o restricción del estro, la forma respiratoria que conlleva a abortos endémicos y por último la forma septicémica caracterizada por generar encefalitis en neonatos. El avance alcanzado por la ganadería en los últimos años ha generado la necesidad de desarrollar nuevos métodos de diagnóstico que aseguren mayor especificidad, sensibilidad y rapidez en la detección de enfermedades. El presente estudio se centró en la identificación de Herpesvirus bovino tipo 1 mediante la amplificación del gen de la glicoproteína C (gC) debido a su asociación con una de las afecciones respiratorias (IBR) de mayor relevancia en el ganado bovino. Se utilizó el virus aislado en células primarias de testículo de ternero para la estandarización del protocolo. Se compararon cuatro diferentes métodos de extracción centrándonos en la estabilidad y pureza de ADN extraído. La determinación genotípica del virus se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa, con la cual se pudo evidenciar que es la técnica más sensible, específica, rápida y menos laboriosa que los métodos de aislamiento viral y los ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA). Adicionalmente se estandarizó la técnica mediante la variación de las concentraciones de cloruro de magnesio y cebadores. Además, se realizó un gradiente de temperatura de hibridación para determinar el rango específico en el cual los cebadores se unen al ADN blanco. Posteriormente se identificaron los límites de detección en tres diferentes matrices (DMEM, tejido epitelial y semen) utilizando como contaminante directo el ADN viral y el sobrenadante del virus obtenido después del proceso de replicación y aislamiento viral. El presente trabajo tiene como fin establecer un método para la detección molecular de Rinotraqueitis infecciosa bovina en ganado reproductor.

Palabras clave: Herpesvirus bovino tipo 1, Rinotraqueitis infecciosa bovina, PCR, estandarización, infección, bovinos.

ABSTRACT

Bovine infectious rhinotracheitis is a disease caused by bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1). This causes great economic losses in the agricultural sector, constituting a serious problem at the global level in both beef and dairy cattle. The disease is presented in three main forms: the reproductive or genital form with the increase or restriction of estrus, the respiratory form that leads to endemic abortions, and finally the septicemic form characterized by generating encephalitis in neonates. The progress achieved by livestock in recent years has generated the need to develop new diagnostic methods that ensure greater specificity, sensitivity and speed in the detection of diseases. This study is focused on the identification of bovine herpesvirus type 1 by amplification of the glycoprotein C gene (gC) due to its association with one of the most relevant respiratory conditions (IBR) in cattle. We used the isolated virus in primary cells of calf testicle for the standardization of the protocol. Four different extraction methods were compared focusing on the stability and purity of extracted DNA. The genotypic determination of the virus was performed by polymerase chain reaction, which showed that this technique is more sensitive, specific, quicker and less laborious than the methods of viral isolation and Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). In addition, the technique was standardized by varying concentrations of magnesium chloride and primers. In addition, a hybridization temperature gradient was performed to determine the specific range in which the primers join to the sample DNA. Later, the detection limits were identified in three different matrixes (DMEM, epithelial tissue and semen) using as direct contaminant the viral DNA and the supernatant of the virus obtained after the process of replication and viral isolation. The aim of this paper is to establish a method for the molecular detection of bovine infectious rhinotracheitis in reproductive livestock.

Keywords: Bovine herpesvirus type 1, bovine infectious rhinotracheitis, PCR, standardization, infection, bovines.

ÍNDICE

| | | |
|-------|------------------------------------|----|
| 1. | CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 | Antecedentes..... | 1 |
| 1.2 | Planteamiento del problema | 2 |
| 1.3 | Objetivos..... | 4 |
| 1.3.1 | Objetivo general..... | 4 |
| 1.3.2 | Objetivos específicos | 4 |
| 1.4 | Justificación..... | 4 |
| 2. | CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO | 5 |
| 2.1 | Historia..... | 5 |
| 2.2 | Agente etiológico | 6 |
| 2.2.1 | Taxonomía y estructura | 6 |
| 2.2.2 | Clasificación..... | 8 |
| 2.2.3 | Características biológicas | 8 |
| 2.2.4 | Genoma | 10 |
| 2.3 | Transmisión de la enfermedad..... | 11 |
| 2.3.1 | Entrada y diseminación..... | 11 |
| 2.3.2 | Mecanismo de infección viral | 12 |
| 2.3.3 | Latencia | 14 |
| 2.4 | Epidemiología..... | 15 |
| 2.5 | Patogénesis | 15 |
| 2.6 | Signos y patología..... | 16 |
| 2.6.1 | Forma respiratoria..... | 17 |
| 2.6.2 | Forma abortígena | 18 |
| 2.6.3 | Forma Genital | 18 |
| 2.6.4 | Forma ocular..... | 20 |
| 2.6.5 | Forma digestiva | 21 |
| 2.7 | Diagnóstico | 21 |

| | |
|--|-----------|
| 2.7.1 Aislamiento viral..... | 22 |
| 2.7.2 Detección de antígeno viral | 22 |
| 2.7.3 Detección de anticuerpos virales | 23 |
| 2.7.4 Ensayos con inmunoperoxidasa | 23 |
| 2.7.5 Detección de ácido nucleico viral..... | 24 |
| 3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL ... | 24 |
| 4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS..... | 26 |
| 4.1 Lugar de realización de la investigación | 26 |
| 4.2 Cultivo celular..... | 26 |
| 4.2.1 Cultivo primario de testículo de ternero | 26 |
| 4.2.2 Disgregación celular | 27 |
| 4.2.3 Conteo celular..... | 27 |
| 4.2.4 Cálculo del número celular | 28 |
| 4.3 Cepa control | 28 |
| 4.4 Aislamiento viral en cultivo celular | 29 |
| 4.5 Titulación viral de la cepa control | 29 |
| 4.6 Detección molecular de BoHV-1..... | 30 |
| 4.7 Métodos de extracción de ADN | 30 |
| 4.7.1 Método de fenol saturado | 30 |
| 4.7.2 Método Chelex 100 sodium (Sigma, EEUU)..... | 31 |
| 4.7.3 Método empleando el Paquete de Extracción (Viral RNA/DNA Mini Kit) 31 | |
| 4.7.4 Método empleando el Paquete de Extracción (High Pure Viral Nucleic Acid Kit) | 31 |
| 4.7.5 Cuantificación del ADN..... | 32 |
| 4.8 Cebadores..... | 32 |
| 4.9 Protocolo estándar de amplificación génica..... | 32 |
| 4.9.1 Verificación de la integridad del ADN..... | 34 |
| 4.9.2 Optimización de la temperatura de anillado..... | 34 |
| 4.9.3 Optimización de la concentración de cebadores | 34 |
| 4.9.4 Optimización de la concentración de cloruro de magnesio..... | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 4.9.5 Electroforesis y visualización de amplicones | 37 |
| 4.9.6 Sensibilidad analítica | 37 |
| 4.9.7 Sensibilidad específica | 38 |
| 4.10 Determinación de especificidad | 40 |
| 5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSION | 40 |
| 5.1 Cultivo celular y aislamiento viral..... | 40 |
| 5.2 Conteo celular y titulación viral..... | 44 |
| 5.3 Comparación de diferentes métodos de extracción de ADN | 45 |
| 5.4 Protocolo estándar de amplificación génica..... | 47 |
| 5.5 Integridad del ADN e importancia del DMSO en PCR..... | 49 |
| 5.6 Optimización de la temperatura de hibridación | 51 |
| 5.7 Optimización de la concentración de cebadores | 52 |
| 5.8 Optimización de la concentración de cloruro de magnesio | 54 |
| 5.9 Sensibilidad analítica..... | 55 |
| 5.9.1 Inoculación de ADN viral en medio de cultivo celular DMEM..... | 55 |
| 5.9.2 Inoculación de ADN viral en células de tejido epitelial | 57 |
| 5.9.5 Inoculación del sobrenadante viral en células de tejido epitelial | 63 |
| 5.9.6 Inoculación del sobrenadante viral en semen | 65 |
| 5.10 Especificidad | 67 |
| 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 69 |
| 6.1 Conclusiones | 69 |
| 6.2 Recomendaciones..... | 70 |
| REFERENCIAS | 71 |

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Los virus que forman parte de la familia *Herpesviridae* poseen una envoltura de 200 a 300 nm de diámetro, y su genoma está formado por una doble cadena de ADN que varía entre 120 a 250 Kbp. La familia está conformada por tres subfamilias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*. Los herpesvirus identificados en bovinos pertenecen principalmente a las subfamilias *Alpha* o *Gamma-herpesvirinae* (Breese y Dardiri, 1972). Este tipo de virus poseen la capacidad de generar infecciones latentes que pueden permanecer en el huésped durante toda su vida, y por lo tanto, el animal puede presentar niveles de anticuerpos circulantes (Vera et al, 2009).

El Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1), o también llamado virus de la Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) / vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV) forma parte de la familia *Herpesvirinae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus* (Miller et al, 1991; Babiuk et al, 1996). Se han determinado dos subtipos: BoHV-1.1 (IBR) y BoHV-1.2 (IPV), este último se subdivide en BoHV-1.2^a y BoHV-1.2^b (Van Oirschot, 1996; Wellenberg et al, 1998). La detección de estos virus se realiza mediante el uso de paneles de anticuerpos monoclonales, electroforesis en geles de poliacrilamida de proteínas virales, el análisis de las diferencias en el ácido nucleico viral usando enzimas de restricción o con métodos de aislamiento viral utilizando cultivo celular (Betancurt et al, 2006). El subtipo 1.1 se asocia con la forma respiratoria de la enfermedad (IBR), mientras que el subtipo 1.2 se asocia no solo con las enfermedades respiratorias sino también con las que afectan el tracto genital bovino (Brenner et al, 2009).

Los dos subtipos de BoHV-1, difieren en los epítopes de la glicoproteína C (gC), mediante los cuales se puede alterar la adhesión viral, lo que puede influir en la virulencia que estos presenten. Las cepas del subtipo BoHV-1.1 poseen un nivel

de virulencia superior en comparación con BoHV-1.2 y causan las enfermedades de mayor severidad asociadas a las infecciones respiratorias en ganado de carne y lechero. El subtipo (BoHV-1.1) es excretado en altos títulos en semen, secreciones nasales y sangre por lo que su nivel de diseminación en el hato es alto (Zanabria, 2000; Vera et al, 2009).

Los métodos de extracción de ADN viral han sido ampliamente reportados en la literatura, de forma rutinaria se han empleado métodos tradicionales como el de fenol saturado y la resina Chelex 100 sodium, en los cuales se utilizan diferentes tiempos de incubación y la extracción por solventes orgánicos (Ruiz, 1977; Obando y Rodríguez, 2005). Sin embargo, se han identificado pocos trabajos en los cuales se utilicen métodos de extracción de ADN viral con juegos de extracción basados en columnas de sílice, las cuales permitan obtener un ADN de mejor calidad y estable en los tampones de elución (Sánchez, 2003; Vera et al, 2009).

1.2 Planteamiento del problema

Las enfermedades causadas por el virus de la Rinotraqueitis infecciosa bovina han llegado a causar grandes inconvenientes en el sector ganadero a nivel mundial, disminuyendo la producción de carne y leche (Chase et al, 1995; Schwyzer & Ackermann, 1996). Las enfermedades virales que afectan al ganado bovino son una de las principales causas de pérdidas económicas en el Ecuador debido a que generan problemas respiratorios y abortivos graves (Martin et al, 1997; Gomez, 2003; Kalman & Egyed, 2005). En Sudamérica se han reportado aproximadamente \$ 800 millones de pérdidas en ganado lechero y más de \$ 1,700 millones en ganado de carne a causa de infecciones virales, que además generan problemas reproductivos (Papich et al, 2003; Pariente, 2006; Condori, 2014).

El diagnóstico de IBR en el laboratorio se realiza a través de varios métodos clásicos que permiten la detección del agente infeccioso, algunos de estos son: la identificación por neutralización viral o técnicas de inmunohistoquímica, el

aislamiento viral y análisis serológicos de detección de la reacción antígeno-anticuerpo (Condori, 2014). Sin embargo, el aislamiento viral requiere que el desarrollo de cultivos celulares sea factible, pues es necesaria la presencia del virus en estado replicativo y un largo período de tiempo para la obtención de los resultados lo cual dificulta la caracterización de cada cepa viral presente en la muestra (Zacarias, 2002; Villacaqui et al, 2006). Por otra parte, los resultados obtenidos por detección de la reacción antígeno-anticuerpo, por ejemplo la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (“ELISA” acrónimo en inglés) no nos demuestra, con certeza si el virus se encuentra en su fase activa o inactiva. Por otra parte, la vacunación para la prevención de la infección por estos virus genera falsos positivos al momento del análisis de las muestras clínicas. Las técnicas antes mencionadas son laboriosas y de mayor costo, por lo cual resulta necesaria la aplicación de otros métodos con mayor sensibilidad y especificidad que puedan determinar la presencia de los virus en los hatos ganaderos (Sánchez, 2003; Vera et al, 2009).

Ecuador al ser un país donde la ganadería representa una de las principales aportaciones económicas al producto interno bruto, no cuenta con protocolos de detección adecuados para enfermedades virales como IBR. La falta de información sobre estas enfermedades y la carencia de métodos de detección eficaces, han generado pérdidas económicas graves y una disminución en los procesos productivos a nivel nacional (Pimentel, 2014). Los protocolos de detección de IBR en Ecuador se centran solo en el análisis de la reacción antígeno-anticuerpo que no determina con seguridad la presencia del virus en estado latente, mientras que los métodos de detección a nivel molecular no se han implementado en el país y la prevalencia de la enfermedad a nivel nacional es aún desconocida (Richey, 1994; Rios y Alberto, 2000; Pidone et al, 2006).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Estandarizar un protocolo de detección molecular de Rinotraqueitis infecciosa bovina utilizando la reacción en cadena de la polimerasa.

1.3.2 Objetivos específicos

- Comparar diferentes métodos de extracción de ADN y su eficiencia para el proceso de identificación viral.
- Ajustar las condiciones óptimas de amplificación génica para la detección de Rinotraqueitis infecciosa bovina por reacción en cadena de la polimerasa.
- Determinar la sensibilidad y especificidad del protocolo de amplificación estandarizado.

1.4 Justificación

En el Ecuador la ganadería es una de las actividades pecuarias más importantes, ya que el ganado bovino tiene una capacidad de adaptación a cualquier región del país. Esto implica bajos costos de producción y alto rédito económico en comparación con la cría de otros animales de granja. Por lo tanto, la importancia del estudio radica en que la investigación contribuirá a la identificación de Rinotraqueitis infecciosa bovina en Ecuador utilizando técnicas moleculares no aplicadas hasta ahora en la identificación de estos agentes patológicos, causantes de enfermedades que afectan a la economía y al desarrollo del país.

Como aporte académico y científico tenemos el establecimiento de protocolos de identificación del ADN viral con mayor sensibilidad y especificidad, mediante la amplificación de secuencias genéticas seleccionadas, cuya implementación disminuirá los falsos positivos y falsos negativos que en la actualidad se presentan al utilizar como métodos de diagnóstico pruebas serológicas y evitando los

laboriosos aislamientos virales basados en cultivos celulares, la identificación viral empleando enzimas de restricción y la neutralización de agentes virales.

El desarrollo de esta investigación favorecerá de forma directa al productor ganadero, disminuyendo el posible contagio y propagación de estas enfermedades virales gracias a la detección temprana de animales contagiados y de forma indirecta al consumidor garantizando su seguridad alimentaria. Por otra parte, aportará a la economía del país al impedir pérdidas del ganado por infecciones virales y así generando rédito económico, en un sector de gran relevancia.

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Historia

La Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) es conocida también como lloriqueo de los terneros, nariz roja, exantema coital y vaginitis vesicular. Esta enfermedad es altamente contagiosa y es causada por un tipo de herpes virus, cuyas manifestaciones clínicas se presentan de diferentes maneras (Ruiz, 1977; Blood y Radostits, 1992).

Esta enfermedad fue descrita por primera vez por Rychner (veterinario suizo) en 1844, quien pudo evidenciar los signos clínicos de IPV (Vulvovaginitis pustular infecciosa) y observó sus características de enfermedad de transmisión venérea. En 1928 Reisner y Reiman inician las investigaciones a profundidad de la naturaleza y transmisión del virus. Posteriormente, a mediados de los años cincuenta, se presentó en Estados Unidos un brote de una enfermedad respiratoria aguda desconocida en el ganado, a partir de la cual se pudo aislar un virus con características de herpes. En el año 1953 se presentaron brotes de la infección en hatos lecheros y lotes de engorde en California y debido a esto, el virus se distribuyó en varios estados de EEUU; al mismo tiempo en Europa, fue reportado el primer caso de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en Alemania en 1960,

y posteriormente en diversos países de la Unión Europea (Miller et al, 1991; Gibbs y Rweyemamu, 1977).

Hasta los años 60 se tenía la idea de que los países de Suramérica se encontraban libres de IBR, pero durante esta década se realizaron aislamientos virales en bovinos exportados de Norteamérica hacia el Perú (Zapata et al, 2016). Al realizar comparaciones entre estos aislamientos con los asociados a las formas genitales descritas en Europa, se determinó que las dos cepas eran indistinguibles, por lo tanto eran provocadas por el mismo virus (Fenner et al, 1992).

Huck en 1961 describió brotes de la enfermedad en centros de inseminación artificial (IA), mientras que Saxegaard y colaboradores, en 1966 realizaron muestreos en toros clínicamente sanos y obtuvieron aislamientos de este agente infeccioso. Por otro lado, Sprabdrow en 1968 obtuvo el virus a partir de pajillas de semen congelado (Gibbs y Rweyemamu, 1977).

En la actualidad esta enfermedad se encuentra distribuida ampliamente a nivel mundial. Ha sido diagnosticada en Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, México, Tanzania, Australia, Japón y en varios países de América del Sur como Colombia, Brasil, Argentina, Cuba entre otros (Hurtado et al, 2006).

2.2 Agente etiológico

2.2.1 Taxonomía y estructura

Los herpesvirus son virus caracterizados por tener un ADN lineal de doble cadena. Poseen una cápside icosaédrica de 100 a 110 nm de diámetro, la cual se encuentra dentro de una envoltura lipídica; su ADN es lo suficientemente largo para codificar de 80 a 100 proteínas, de las cuales aproximadamente 50 han sido identificadas. De estas cincuenta proteínas identificadas, al menos 30 son proteínas estructurales, por lo tanto se asume que las que restan son enzimas

inducidas por el virus en las cuales se incluyen ADNasa, ADN polimerasa y Timidina kinasa. El prototipo diferencial que incluye a estos virus es el Herpes Simplex (Sáenz et al, 2010).

Los herpes virus poseen la capacidad de generar infecciones latentes. Estas infecciones se establecen permanentemente en el huésped a lo largo de toda su vida, incluso se pueden encontrar niveles de anticuerpos circulantes (Sáenz et al, 2010).

De acuerdo con la citopatología, ciclo reproductivo y las características de la infección latente, se pueden establecer las siguientes subfamilias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*; siendo los géneros los que reflejan las verdaderas relaciones filogenéticas entre familias, basándose en la homología de la secuencia de nucleótidos, en la estructura del genoma y en relaciones serológicas (Vera y Betancur, 2008):

- *Alphaherpesvirinae*: Esta familia está caracterizada por un amplio rango de huéspedes. Poseen una rápida difusión y corto período de replicación en cultivos celulares. Los géneros presentes en la subfamilia son: *Varicellovirus* y *Simplexvirus*, de los cuales se pueden diferenciar las siguientes especies: herpesvirus humano tipo 1, herpesvirus bovino tipo 1, 2 y 4, herpesvirus porcino, herpesvirus felino, herpesvirus canino y herpesvirus tipo 1 de aves (Vera y Betancur, 2008).
- *Betaherpesvirinae*: Son virus citomegálicos de crecimiento lento y se caracterizan por tener un rango estrecho de huéspedes. Su ciclo de replicación puede variar dependiendo de la especie así como de su efecto citopático en cultivos celulares. Los géneros que resaltan en esta subfamilia son: citomegalovirus (herpes virus humano tipo 5), murimegalovirus (megalovirus de ratón tipo 1) y el roseolovirus (herpes virus humano tipo 6) que afecta a los linfocitos T y B (Vera y Betancur, 2008).
- *Gammaherpesvirinae*: Estos virus tienen la capacidad de replicarse en células linfoblastoides y pueden afectar también a células fibroblastoides y

epiteliales, siendo específicos de linfocitos T y B. Los géneros presentes en esta subfamilia son: linfocriptovirus (herpesvirus humano tipo 4), rhadinovirus y tetallinfocriptovirus que ocasiona la enfermedad de Marek (Vera y Betancur, 2008).

2.2.2 Clasificación

La Rinotraqueitis Infecciosa Bovina/vulvovaginitis pustular infecciosa pertenece al grupo del herpesvirus bovino tipo 1, familia *herpesvirinae*, subfamilia *alphaherpesvirinae*, género varicellovirus. Se han descrito dos subtipos: BoHV-1.1 y BoHV 1.2 y éste a su vez se divide en BoHV-1.2^a y BoHV-1.2^b, basándose en la utilización de paneles de anticuerpos monoclonales, el uso de electroforesis de proteínas virales en geles de poliacrilamida, la amplificación diferencial de genes específicos por el ensayo de PCR y la digestión con enzimas de restricción. El subtipo 1.1 está asociado directamente con la forma respiratoria de la enfermedad (IBR), mientras que el subtipo 1.2 se asocia no sólo con la enfermedad respiratoria sino también con la genital (IPV/IPB) (Ackermann, 1990).

Los dos subtipos difieren específicamente en los epítopes de la glicoproteína C (gC). Esto implica que puede verse alterada la adhesión viral a la matriz celular e influir en el nivel de virulencia de cada uno de los subtipos (Ackermann, 1990). Las cepas pertenecientes al subtipo BoHV-1.1 son las que poseen el mayor nivel de virulencia y son las causantes de las enfermedades infecciosas de mayor severidad y mortandad. Este subtipo posee la capacidad de ser excretado en títulos elevados en secreciones nasales y de esta forma puede ser diseminado de una forma más efectiva que el BoHV-1.2 (Ruiz, 1977).

2.2.3 Características biológicas

Los herpesvirus poseen una envoltura con un diámetro aproximado de 150-200 nm, una cápside con isometría icosaédrica de 100 nm de diámetro que posee 162

capsómeros (150 hexámeros y 12 pentámeros) y un ADN lineal de doble cadena. La cápside está rodeada por un tegumento (material globular), y a su alrededor, posee una envoltura que en su parte externa contiene las espículas de glicoproteínas virales (Murphy et al, 1999).

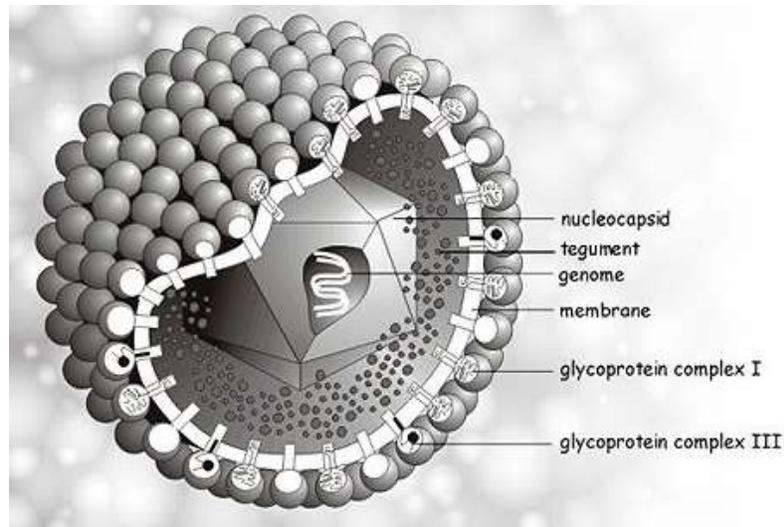


Figura 1. Estructura general de los Herpesvirus

Tomado de: Vera Y Betancur (2008)

La multiplicación de BoHV-1 en medios de cultivo celular con células de origen bovino genera efecto citopático, el cual se caracteriza por formar cuerpos de inclusión intranucleares al iniciar la infección y posteriormente las células se expanden y forman los “racimos de uva” hasta llegar a la destrucción total de la monocapa (Lesko et al, 1993; Suresh et al, 1999).

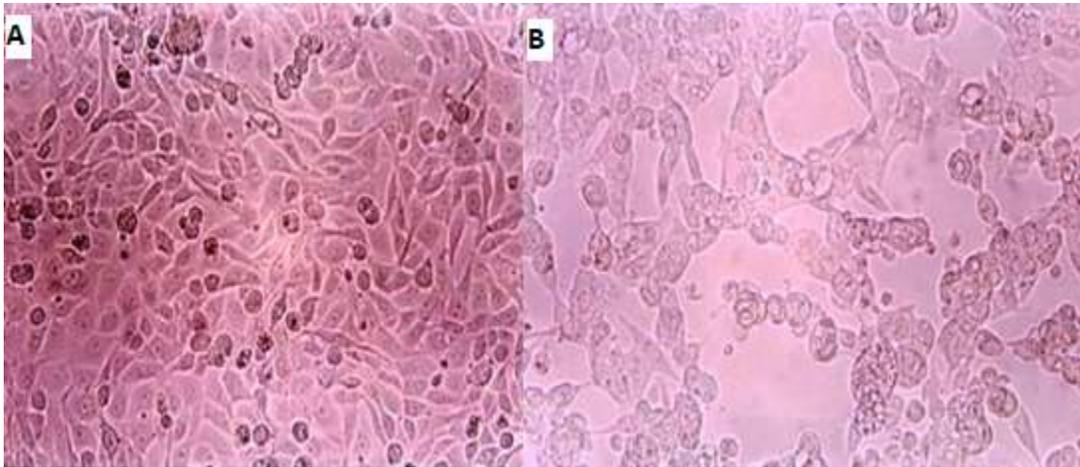


Figura 2. Cultivo de células MDBK.

Tomado de: Vera Y Betancur (2008)

- a) Células sin inoculación de BoHV-1.
- b) Efecto citopático del virus a las 24 horas de inoculación.

Otras características del virus son su sensibilidad al calor, a la tripsina y al éter. Se mantiene estable en un pH igual a 7 o ligeramente básico y no posee la capacidad de resistir a la deshidratación (Griffin et al, 1958; Rouhander et al, 1967; Bartha et al, 1969, citados por Barrera, 1996).

2.2.4 Genoma

El virión del BoHV-1 posee un genoma de ADN de doble cadena de 135000-140000 pb, medidas por patrones de restricción con endonucleasas al momento del mapeo genómico. Su genoma codifica aproximadamente 70 proteínas de las cuales 54 se han podido identificar en los casos de infecciones reproductivas (Rodas et al, 2016). De las proteínas virales reconocidas hasta el momento se han identificado 33 estructurales, de las cuales 14 se encuentran implicadas en la nucleocápside, 13 en la envoltura viral y 6 de las cuales no se han determinado sus funciones, además de 15 no estructurales (Rodas et al, 2016).

El genoma del herpesvirus bovino tipo I (BoHV-1) codifica de un número variado de proteínas, con pesos moleculares que varían desde los 42 hasta los 180 kDa. Las glicoproteínas codificadas por el genoma, que tienen mayor importancia son: I, II, III, IV, 42 y 93. Por otro lado se han identificado las C, E, G y la I pertenecientes a los herpesvirus simples tipo I (Rodas et al, 2016).

2.3 Transmisión de la enfermedad

2.3.1 Entrada y diseminación

Las vías para el ingreso del virus son la cavidad orofaríngea, ocular, nasal y el tracto genital (Blood y Radostits, 1992; Ruiz, 1977).

El paso del BoHV-1 de una población infectada a otra y el ingreso a países y territorios libres de la enfermedad se produce casi únicamente a través de animales que presenten la infección latente y, en algunas circunstancias, por contagio con semen contaminado con el virus (Aycardy, 1978).

El BoHV-1 es transmitido de forma directa por contacto con animales infectados, aerosoles, secreciones oculares, respiratorias y del tracto reproductivo o también puede ser transmitido por semen, durante la inseminación artificial o la monta natural (Wiedmann, 1993; Van Oirschot, 1995) e incluso se ha demostrado que puede existir contagio durante la transferencia de embriones (Rios et al, 2000) o en forma indirecta a través de equipos y personas. Las sobrecargas al momento de ser transportado el ganado pueden producir la activación, excreción y producción del virus latente, y en casos extremos, manifestaciones clínicas debido al estrés producido por el transporte (Kelly et al, 1993).

El IBR en su forma respiratoria se presenta principalmente en fincas donde existe una alta concentración de animales, en las cuales la enfermedad tiene mayor posibilidad de diseminación, principalmente a terneros menores de ocho meses (Ruiz, 1977). Se ha demostrado que los cerdos pueden contraer IBR y no

presentar síntomas clínicos durante toda su vida, sin embargo, tendrían la capacidad de transmitir la infección al ganado si se establece una convivencia directa y permanente entre ellos (Ruiz, 1997), aunque aún no existen estudios que demuestren las implicaciones epidemiológicas del virus en cerdos (Vera, 2006).

2.3.2 Mecanismo de infección viral

El BoHV-1 entra a las células por fusión de su envoltura con la membrana plasmática celular, en un proceso independiente de pH y dependiente de la unión de glicoproteínas virales presentes en la envoltura del virus con los receptores en la membrana celular (Wittels y Spear, 1990). 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 (Li et al., 1995; Schroder y Keil, 1999; Dasika y Letchworth, 1999; Hanon et al., 1999; Dasika y Letchworth, 2000). Los BoHV-1.1 y BoHV-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 BoHV-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 (Hanon et al., 1998; Tyler y Nathanson, 2001) a través de las glicoproteínas virales gB y gC (Li et al., 1996). Luego de esta unión inicial, las gB y gD se unen con alta afinidad a sus receptores putativos en la membrana celular (Li et al., 1995). Estudios más recientes para identificar estos receptores de alta afinidad, han mostrado que la gD de BoHV-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 (Geraghty et al., 1998; Connolly et al., 2001). Esta unión débil, indica que la entrada del BoHV-1 en el hospedero bovino puede estar mediada por la interacción de la gD con receptores diferentes a los homólogos bovinos del HveC o PVR (Geraghty et al., 1998; Connolly et al., 2001).

Después de la entrada a las células del hospedero, el BoHV-1 es transportado a través de los microtúbulos hasta el núcleo; donde de manera ordenada y secuencial replica su genoma usando proteínas virales y celulares; dependiendo del momento en que los genes virales son expresados durante la replicación son clasificados en tres clases: inmediatos tempranos, tempranos y tardíos (Roizman y Pellet, 2001). Luego del ensamblaje, los viriones abandonan el núcleo y se dirigen hacia la membrana citoplasmática externa por procesos de gemación a partir de membranas intracitoplasmáticas, adquiriendo su envoltura y tegumento. Luego son transportados dentro de vesículas intracelulares a la membrana citoplasmática para su posterior liberación de la célula (Hunter, 2001). La replicación del genoma del BoHV-1 comienza dentro de las dos horas siguientes a la infección inicial del animal (Meurens et al., 2004) con la expresión de antígenos en la superficie celular entre las tres a cuatro horas siguientes a la infección y liberación de partículas virales y dispersión a las ocho horas posinfección (Babiuk et al., 1996).

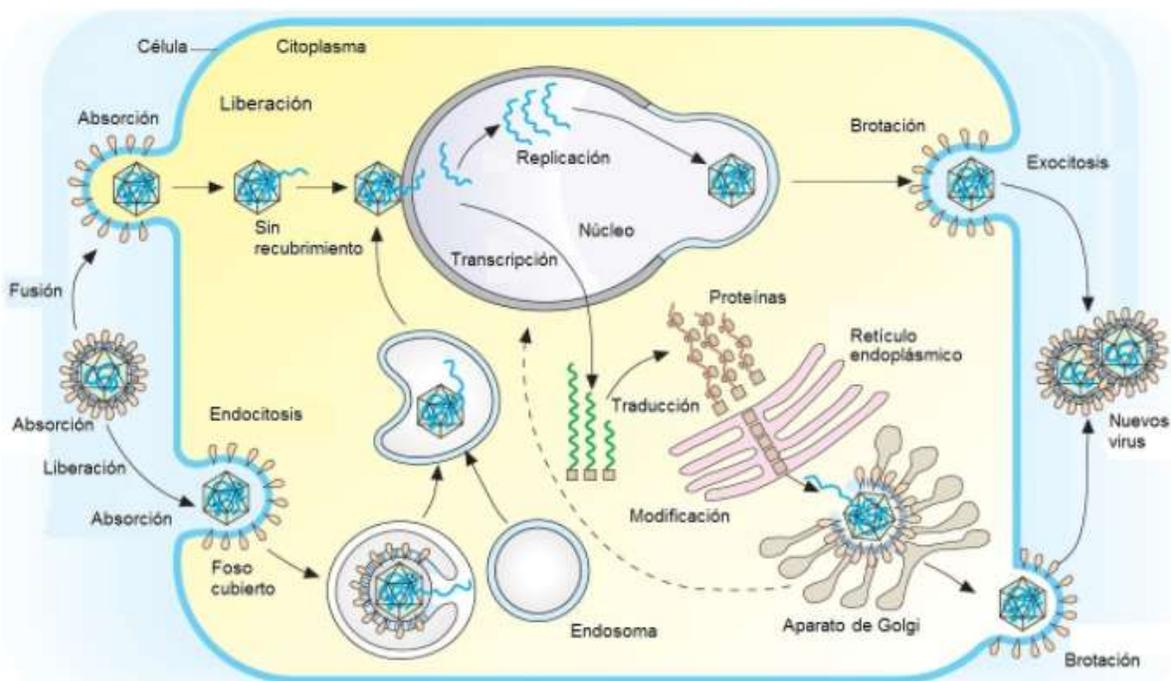


Figura 3. Ciclo de replicación viran

Tomado de: Ruiz et al. (2008)

2.3.3 Latencia

El estado de latencia es aquel en el que el virus no se encuentra activo en el huésped animal, pero permanece viable para una infección, con períodos de reexcreción y reactivación durante los cuales el virus no puede ser detectado por métodos convencionales. Después de que se ha iniciado la replicación en el sitio de infección, el virus invade el sistema nervioso y se localiza en los ganglios nerviosos; en los cordones sacro espinal y ciático cuando se trata de infecciones genitales y en el trigémino en infecciones respiratorias (Góngora et al, 1995; Rodas et al, 2016).

Dentro de los factores de latencia asociados al virus en bovinos infectados de forma intermitente, se pudo encontrar una región del genoma activa transcripcionalmente durante la latencia. Esta región fue denominada “gen relacionado con latencia” (LR), y tendría la capacidad de controlar la expresión de diversas proteínas inmediatas tempranas (IE), las cuales favorecen el proceso de latencia. Por otro lado, se ha demostrado que las proteínas codificadas por la LR incrementan la persistencia del virus en las células neuronales infectadas (Vera, 2006).

Mientras que, entre los factores de latencia asociados al huésped podemos mencionar el factor de crecimiento neuronal (NGF); un péptido con acción endocrina e inmune, que cuando es bloqueada provoca la reactivación del virus latente en células de cultivos neuronales (Schang et al, 1996; Rodas et al, 2016; Wilcox y Johnson, 1987); del mismo modo se ha descubierto mediante la utilización de hibridación *in situ*, la presencia de transcritos asociados a la fase de latencia viral (*lat's*) en los ganglios nerviosos de humanos infectados con Herpesvirus simple tipo 1 (HSV-1). Los *lat's* podrían bloquear los genes que inician la transcripción, por lo tanto suprimen la expresión de genes que controlan el ciclo lítico, que interfieren en los procesos de latencia viral (Vera, 2006).

2.4 Epidemiología

La distribución geográfica del virus IBR (vIBR) es mundial, se han obtenido reportes de la presencia de BoHV-1 en diferentes países de los cinco continentes. Si bien no existe una preferencia por la raza del animal, si se observa prevalencia en animales mayores de seis meses de edad, debido a que los anticuerpos maternos están presentes en el organismo de la cría, durante los primeros seis meses de vida. Se ha reportado que la morbilidad en el ganado de carne se encuentra entre el 20-30%, en comparación con el ganado de leche en el cual la mortalidad es de un 3% y la morbilidad del 6% (Blood y Radostis, 1992; Gibbs y Rweyemamu, 1977).

En Ecuador se han realizado varios estudios a nivel serológico siendo las provincias más estudiadas Manabí, Loja y Azuay, aunque hasta la fecha no se cuenta con datos específicos que permitan correlacionar los signos clínicos con la prevalencia de la enfermedad activa.

2.5 Patogénesis

En la enfermedad respiratoria, el virus se ubica en agregados linfoides de la cavidad nasal y de las vías aéreas superiores además de las células epiteliales. El virus se multiplica en tejido conectivo, células epiteliales y células de la submucosa; el efecto viral produce degeneración de los cilios, infiltración de neutrófilos e hipertrofia epitelial; tras la replicación viral inicial, se presenta una viremia corta (Arboleda et al, 2016; Blood y Radostits, 1992; Molano y Rodriguez, 1995).

La enfermedad produce un efecto inmunodepresor en las células de los macrófagos alveolares. El BoHV-1 genera una broncoconstricción intensa del musculo liso, lo cual favorece la acumulación de secreciones en las vías aéreas inferiores, e influye en que el animal presente infecciones secundarias de carácter

bacteriano, principalmente por *Pasterella* que unida al virus PI-3 y a la misma infección por BoHV-1, comprometen la fisiopatología del complejo respiratorio bovino (Arboleda et al, 2016; Conlon, 1987; Molano y Rodriguez, 1995).

Las infecciones pueden ocurrir también en el tracto genital y en el tracto respiratorio superior y debido a que el virus disminuye la eficiencia de la respuesta inmune, se transforman en infecciones autolimitantes; lo que quiere decir que la infección dura entre 1 y 2 semanas (Blood y Radostits, 1992; Ruiz, 1977). Por otro lado, la forma conjuntival de la infección puede ser originada por la migración del virus desde la cavidad nasofaríngea, a través de los conductos nasolagrimales hasta llegar a los tejidos oculares (Pastoret et al, 1980).

Una vez que se ve afectada la mucosa nasal por el virus, este agente tiene la capacidad de colonizar las células de las terminaciones nerviosas y recorrer de manera generalizada el sistema nervioso. Después que ha pasado la infección inicial con BoHV-1, este puede contaminar monocitos de manera prolongada además de infectar linfocitos y macrófagos, los cuales utiliza como medio de transporte hacia diferentes tejidos dentro del hospedador. Este virus tiene la capacidad de causar infecciones sistémicas generalizadas al ser transportado por leucocitos y monocitos periféricos, alcanzando la placenta y al feto, lo que genera abortos. Este signo clínico solo puede ser observado en el último tercio de la gestación, sin que se haya presentado ningún síntoma previo (Blood y Radostits, 1992; Góngora, 1992).

2.6 Signos y patología

Esta enfermedad se caracteriza por un amplio rango de signos clínicos, como resultado de la acción del virus sobre los sistemas genital, digestivo, nervioso y respiratorio, por lo que puede manifestarse de diversas formas (Alvarado et al, 1993; Sáenz et al, 2010; Rios et al, 2000).

2.6.1 Forma respiratoria

Se ha podido determinar que el período de incubación después de una exposición experimental al virus es de aproximadamente 2 a 7 días. La enfermedad se presenta con altas temperaturas (42°C), anorexia, hipertermia de la mucosa nasal, disnea, reducción de la producción láctea y generación de secreción nasal que varía entre mucopurulenta a serosa debido a las complicaciones ocasionadas por bacterias oportunistas (Figura 4); la recuperación de esta enfermedad puede demorar entre 10 a 15 días, y puede llegar a ser mortal cuando se presentan complicaciones tales como la bronquitis obstructiva extensa (Arboleda et al, 2016; Blood y Radostits, 1992; Martínez et al, 2008).



Figura 4. Secreción nasal mucopurulenta y heridas nasales producidas por el Herpesvirus bovino tipo 1.

Tomado de: Ruiz et al, (2008)

Esta es la forma más importante desde el punto de vista económico, debido a que ocasiona la reducción de parámetros productivos a través de la pérdida de peso, disminución en la producción de leche, alta morbilidad y muerte de los animales (Sáenz et al, 2010).

2.6.2 Forma abortígena

Se puede presentar como consecuencia de la forma respiratoria o genital en las vacas gestantes. Desde el momento en que se presenta la forma respiratoria dentro de un hato, los abortos pueden comenzar en las 3 a 6 semanas ulteriores; sin embargo, estos pueden presentarse en cualquier momento de la gestación. Se ha detectado que normalmente los abortos ocurren en los últimos tres meses de gestación aunque esto depende del grado de infección viral. Se ha encontrado que en el 21% de las vacas infectadas provoca falla gestacional (Arboleda et al, 2016).



Figura 5. Aborto producido por una severa infección de Herpesvirus bovino tipo 1. Tomado de: Ruiz et al, (2008)

2.6.3 Forma Genital

La forma genital del virus genera balanopostitis en machos (Figura 6) o vulvovaginitis en hembras (Figura 7); esta forma puede venir acompañada,

aunque es raro, de la forma respiratoria. El único caso reportado en el que se detectó la confluencia de ambas infecciones ocurrió en Inglaterra en el año de 1997 (Pritchard et al, 1997).

Esta forma de la enfermedad se conoce también como exantema coital o vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV), se caracteriza por una respuesta inflamatoria linfoproliferativa y necrosis focal; se producen lesiones a nivel de la mucosa genital que son de tipo nodular o vesicular, las cuales pueden convertirse en heridas ulcerativas (Blood y Radostits, 1992; Miller et al, 1991). El curso de esta enfermedad se extiende entre 8 y 10 días, no induce abortos y es de carácter benigno; puede producir en casos extremos prolapso uterino debido al dolor producido por las lesiones (Arboleda et al, 1996; Miller et al, 1991).

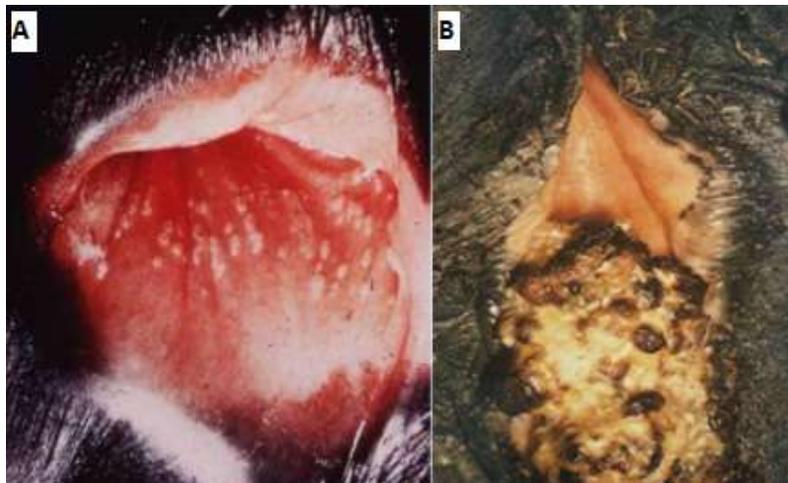


Figura 6. Síntomas producidos por vulvovaginitis pustular infecciosa.

Tomado de: Ruiz et al, (2008)

- a) Respuesta inflamatoria linfoproliferativa.
- b) Lesiones a nivel de la mucosa genital tipo nodular o vesicular.

En la balanopostitis pustular infecciosa (IPB), las lesiones provocadas por la infección son similares a las producidas por el IPV. Cuando las lesiones producidas por la forma genital son demasiado graves pueden producir desviaciones en el pene o adherencias (Blood y Radostits, 1992).

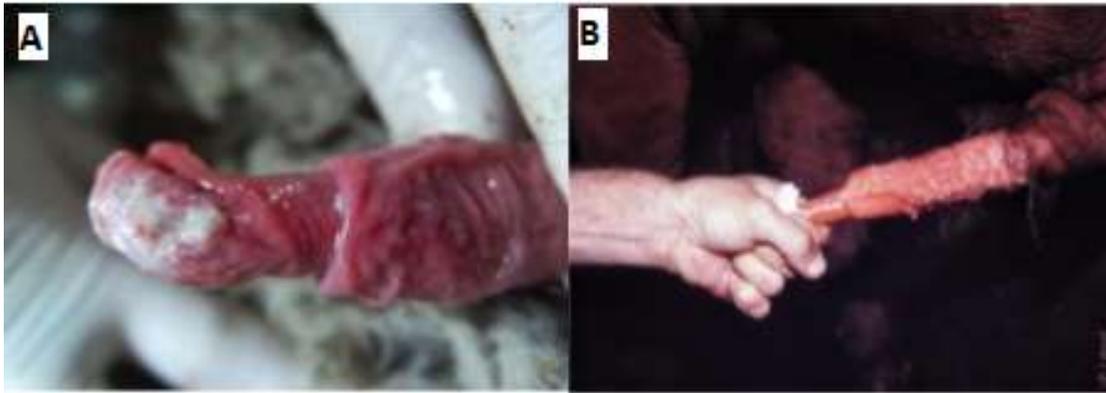


Figura 7. Síntomas producidos por la balanopostitis pustular infecciosa.

Tomado de: Ruiz et al, (2008)

- a) Heridas y laceraciones.
- b) Desviaciones del pene.

Cabe mencionar que se ha determinado que la transmisión del virus puede ocurrir a través de materiales o instrumentos usados para la recolección del semen y en los procesos de inseminación artificial además de que éste por sí mismo puede contener el virus de forma activa (Galvao et al, 2006).

2.6.4 Forma ocular

Esta forma de la enfermedad puede aparecer en compañía de la forma respiratoria y sin reacción sistémica aparente. Se puede observar enrojecimiento e inflamación de la conjuntiva, además de secreción ocular en abundancia llegando a ser mucopurulenta (Figura 8). Se pueden ver afectados ambos ojos o solo uno y puede confundirse con una infección bacteriana (queratoconjuntivitis infecciosa) producida por *Moraxella bovis* (Blood y Radostits, 1992).



Figura 8. Enrojecimiento e inflamación de la conjuntiva, secreción ocular en mucopurulenta generada por Herpesvirus bovino tipo 1.

Tomado de: Ruiz et al, (2008)

2.6.5 Forma digestiva

Esta forma afecta específicamente a terneros de entre 1 a 3 semanas de nacidos, causando diarrea, dificultad respiratoria y fiebre. La enfermedad provoca lesiones necróticas en el tracto digestivo con un porcentaje de mortalidad sumamente alto (Martínez et al, 2008).

2.7 Diagnóstico

Para el diagnóstico de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina se deben tomar en cuenta los hallazgos en la necropsia y los signos y síntomas clínicos, sin embargo, para la detección del virus se requiere de pruebas específicas para un diagnóstico definitivo de la enfermedad (Rock et al, 1992). Dentro de los análisis para la detección viral de BoHV-1 se encuentra la detección del antígeno viral utilizando la prueba de inmunoperoxidasa en tejidos, detección de anticuerpos empleando la técnica de ELISA indirecto, detección del virus mediante aislamiento viral en cultivos celulares y la amplificación de secuencias génicas específicas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Martínez et al, 2008).

2.7.1 Aislamiento viral

Este método de detección posee una baja sensibilidad y alta especificidad, tiene la desventaja de verse limitado por factores ambientales que intervienen durante el almacenamiento y transporte de la muestra. Se debe tomar en cuenta que para obtener resultados exitosos en esta prueba, las muestras ideales son aquellas obtenidas de fetos abortados (cerebro, riñón, bazo, ganglios linfáticos, pulmón, sangre periférica), hisopados nasales o semen. Las muestras deben ser transportadas a -80°C y en medio enriquecido DMEM suplementado con antibióticos de amplio espectro. Es preferible tomar las muestras entre los 7 y 10 días después de iniciada la infección (Martínez et al, 2008).

Esta prueba se realiza en medios de cultivo celular a los cuales se les inocula la muestra proveniente de exudados oculares, genitales, nasales o suspensiones de membranas celulares específicamente afectadas por el virus (tonsilas, mucosa del tracto respiratorio, pulmón, entre otros) (Martínez et al, 2008). Este método ha sido ampliamente reportado, entre los que han utilizado esta técnica para la identificación de BoHV-1 tenemos como ejemplo a Vera y Betancur, 2008 los cuales utilizaron células MDBK para el análisis de exudados nasales y lavados prepuciales y determinaron la sensibilidad del proceso en dichas células.

2.7.2 Detección de antígeno viral

Este método es rápido y muy utilizado en los laboratorios de diagnóstico de enfermedades virales. La técnica se fundamenta en la detección del antígeno viral en muestras de fluidos oculares, nasales, genitales o tejido fresco mediante el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales utilizando la técnica de inmunoperoxidasa o inmunofluorescencia (Martínez et al, 2008). Este método ha sido ampliamente reportado, entre los que han utilizado esta técnica para la identificación de BoHV-1 tenemos como ejemplo a Bracho et al. (2006) los cuales determinaron la presencia del virus en hatos lecheros utilizando sondas de

marcaje viral que dieron como positivo a muestras obtenidas de exudados nasales y lavados prepuciales.

2.7.3 Detección de anticuerpos virales

Este es uno de los ensayos para diagnóstico más utilizados a nivel mundial. Las técnicas más utilizadas son las pruebas de ELISA y la neutralización viral. Una desventaja de los métodos de diagnóstico ELISA, es que no pueden determinar la presencia del virus activo dentro de la muestra a ser analizada ya que no permite diferenciar los anticuerpos generados por infección activa o por vacunación (Navarrete et al, 2002; Sáenz et al, 2010; Martínez et al, 2008). Este método ha sido ampliamente reportado, entre los que han utilizado esta técnica para la identificación de BoHV-1 tenemos como ejemplo a Navarrete et al. (2002) los cuales detectaron el virus activo de manera temprana en cuatro muestras de sangre y procedieron a la obtención de lavados prepuciales para la inoculación en células MDBK para la identificación de efecto citopático y confirmación de la enfermedad.

2.7.4 Ensayos con inmunoperoxidasa

Esta prueba consiste en la detección de antígenos virales presentes en tejidos específicos infectados con el virus. Posee mayor sensibilidad que la técnica de aislamiento viral, y tiene la ventaja de permitir el diagnóstico diferencial del virus en tejidos necróticos, autolisados, embebidos en parafina y/o fijados en formol. Actualmente se utilizan anticuerpos policlonales para la identificación de IBR pero se ha determinado que existe un mayor rango de sensibilidad utilizando anticuerpos monoclonales (Sáenz et al, 2010). Este método ha sido ampliamente reportado, entre los que han utilizado esta técnica para la identificación de BoHV-1 tenemos como ejemplo a Bracho et al. (2006) los cuales identificaron el virus por medio de muestras de tejido epitelial obtenido de la lengua de 46 bovinos que presentaban síntomas de IBR.

2.7.5 Detección de ácido nucleico viral

Esta técnica consiste en la identificación del ADN viral del virus generador de la enfermedad IBR. Entre las técnicas más utilizadas se encuentran la hibridación de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa; en la cual un fragmento de ADN es amplificado mediante el empleo de cebadores específicos que hibridan en una región específica y permiten su amplificación. Este ensayo posee una sensibilidad y especificidad superior a otros métodos o técnicas utilizadas en la identificación de este virus, además de ser rápido, menos laborioso y costoso que otros métodos empleados en la actualidad (Avila et al, 2008). Este método ha sido ampliamente reportado, entre los que han utilizado esta técnica para la identificación de BoHV-1 tenemos como ejemplo a Cardozo et al. (2008) los cuales diseñaron cebadores específicos para el gen de la glicoproteína I y obtuvieron resultados satisfactorios en la identificación del virus en muestras de semen en bovinos.

3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

El diagrama del diseño experimental de la presente investigación se puede observar en la Figura 9.

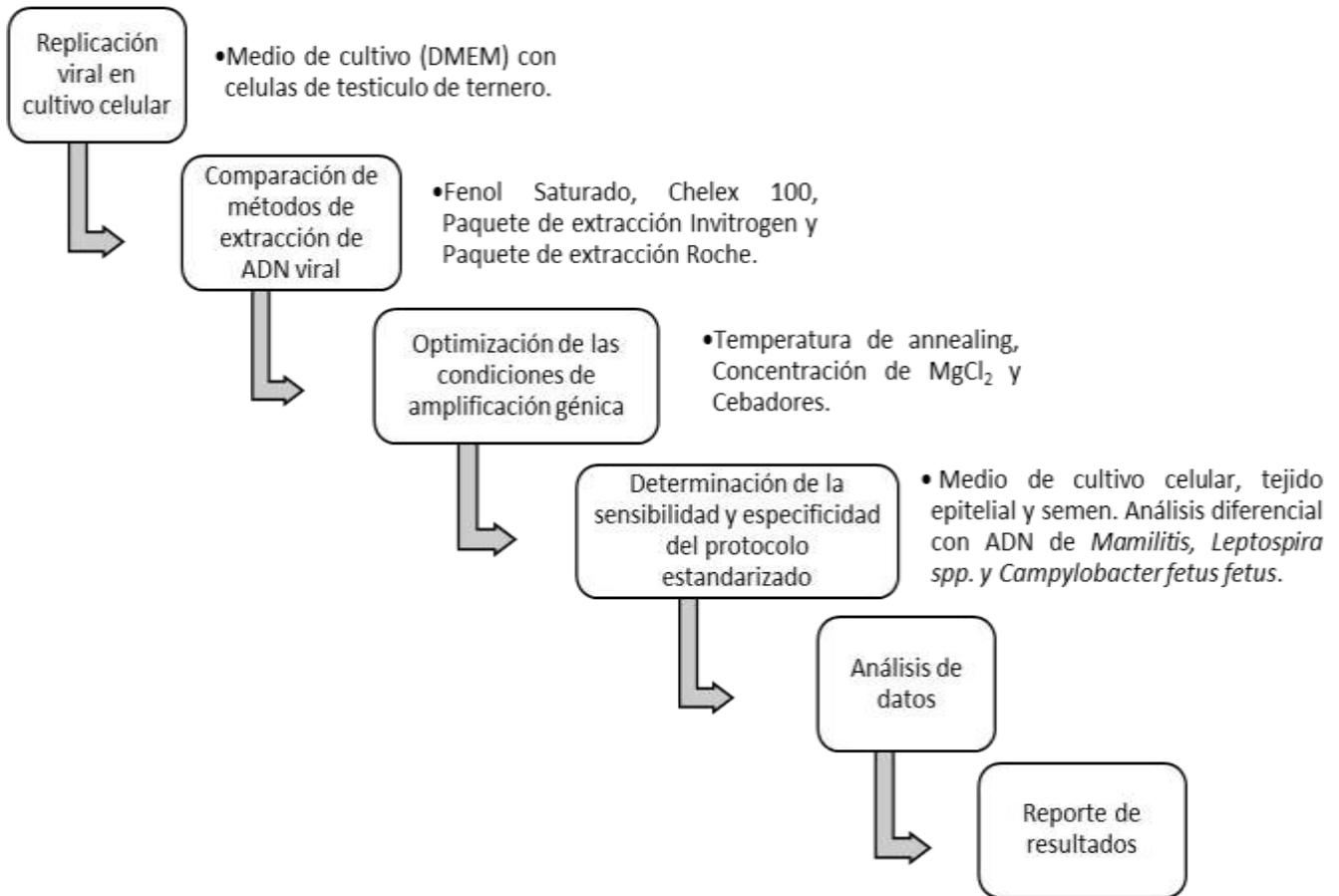


Figura 9. Diseño del plan experimental

4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

4.1 Lugar de realización de la investigación

El presente trabajo experimental se realizó en los Laboratorios de Diagnóstico Animal y Biología Molecular de La Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de Calidad del Agro – AGROCALIDAD (Av. Eloy Alfaro y Av. Interoceánica, Km 14 ½ Tumbaco, Ecuador).

4.2 Cultivo celular

4.2.1 Cultivo primario de testículo de ternero

El proceso de obtención de la suspensión celular se realizó bajo una cámara de seguridad biológica tipo II (Labconco®, EEUU). Los testículos llegaron al laboratorio dentro del escroto en un frasco de PBS suplementado con antibióticos (penicilina-estreptomicina (5000U-5mg/ml) (Sigma, EEUU), gentamicina (50mg/ml) (Gibco, EEUU) y anfotericina B (40mg/ml) (Sigma, EEUU)), se realizó un primer lavado de la muestra biológica con etanol absoluto al 96% para eliminar la mayor cantidad de contaminantes. Los testículos fueron liberados del escroto y se colocaron en una placa, se realizó un segundo lavado con PBS estéril suplementado con antibióticos liberando las capas externas de los testículos hasta obtener tejido interno testicular. Se colocaron entonces en 20 ml de Tripsina (Vitrocel, Brasil) durante 20 minutos para disgregar las células. Posteriormente, se procedió a filtrar por un embudo y la muestra resultante se colocó en tubos de centrifuga (Falcon®, EEUU) de 15 ml, y se centrifugaron a 2000 g por 15 minutos a 4 °C. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se colocaron 2 ml de medio de cultivo (DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma, EEUU), 10% caldo triptosa (Sigma, EEUU), penicilina-estreptomicina (5000U-5mg/ml) (Sigma, EEUU), gentamicina (50mg/ml) (Gibco, EEUU) y anfotericina B (40mg/ml)

(Sigma, EEUU)). La dilución celular de trabajo para el cultivo primario de las células fue de 2:50 (2ml de la suspensión celular [2.5×10^6 /ml] previamente cultivada en frasco (Nunclon™Delta, EEUU) y cuya concentración se obtuvo por cámara de Neubauer, en 48 ml de medio de cultivo). Las células se cultivaron en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂ a 37 °C. Transcurridas 24 horas de cultivo se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco. El crecimiento celular se observó diariamente durante 3-10 días.

4.2.2 Disgregación celular

El proceso de disgregación celular consistió en retirar todo el medio de los frascos de cultivo, se realizaron tres lavados con PBS estéril (4ml en cada lavado de los frascos de cultivo de 100 ml), posteriormente se colocaron 500 µl de tripsina temperada a 37 °C y se agitó el frasco de cultivo hasta desprender las células de las paredes; para frenar la reacción de disgregación celular producida por la tripsina, se añadieron 500 µl de medio de cultivo celular y se procedió a resuspender las células en el medio para su posterior conteo.

4.2.3 Conteo celular

Para determinar el número aproximado de células en el frasco de cultivo se utilizó el método de conteo celular en cámara de Neubauer que a su vez también fue empleado para la titulación viral. El conteo celular se llevó a cabo bajo un microscopio óptico invertido (BestScope modelo BS-2090, China) a un aumento de 25X. El conteo se realizó en los cuatro cuadrantes mayores de la cámara. En la figura 1 se muestran los cuadrantes mayores contados para el cálculo del número de células (1). Las células contadas en cada cuadrante fueron anotadas y sumadas. Si se encuentran en el conteo más de 100 o menos de 20 células por cuadrante se deberá repetir la dilución.

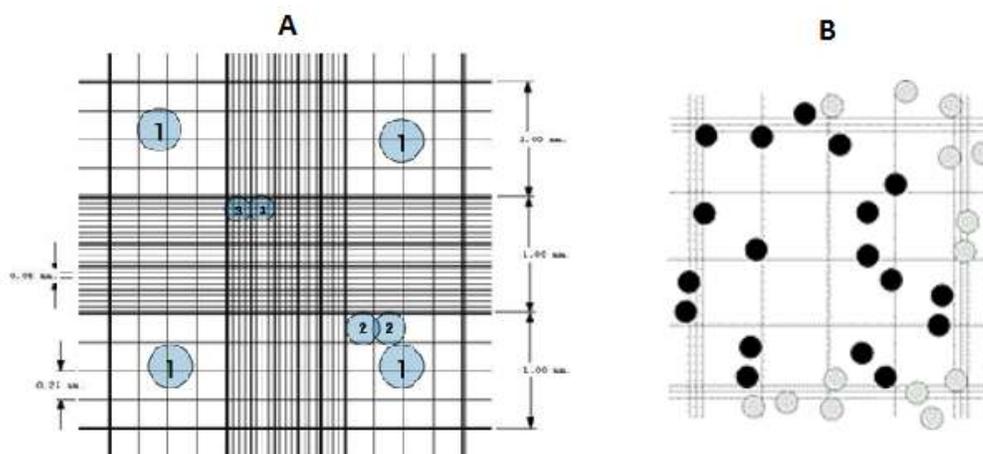


Figura 10. A) Los cuadros numerados con 1 son los que se tomaron en cuenta para el conteo celular. B) Vista ampliada de un cuadro de la cámara de conteo. Las células (○) fuera de las líneas marcadas no serán tomadas en cuenta, mientras que las células dentro del área del cuadro (●) se toman en cuenta para el cálculo (Cardona et al, 2008).

4.2.4 Cálculo del número celular

Para determinar el número total de células por ml, se utilizó la siguiente fórmula que fue tomada del Manual del Usuario Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting, Celeromix, EEUU.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Número de células} \times 10.000}{\text{Número de cuadrados} \times \text{dilución}}$$

Figura 11. Fórmula para la determinación del número de células

4.3 Cepa control

En este estudio se empleó como control positivo la cepa Colorado de Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), número de lote 050 BDV 1301 suministrada por la entidad gubernamental APHIS, EEUU. La cepa del virus se mantuvo a -80

°C y se activó en células de testículo de ternero previo a su utilización en cada una de las etapas de este trabajo de investigación.

4.4 Aislamiento viral en cultivo celular

La cepa utilizada como control positivo fue reconstituida en medio de cultivo celular DMEM suplementado con antibióticos y activada en presencia del cultivo primario de células de testículo de ternero obtenidas como se describió previamente en el apartado 4.2.1. La reconstitución del virus en el medio de cultivo se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial APHIS.

4.5 Titulación viral de la cepa control

La titulación de la cepa viral se realizó en una cámara de seguridad biológica tipo II de bioseguridad descrita previamente. El proceso de titulación se llevó a cabo en platos de cultivo de 96 pocillos (Falcon™, EEUU). Las células de testículo de ternero fueron disgregadas como se describió en el apartado 4.2.2, se realizó el conteo celular y se obtuvo una suspensión celular de 1×10^6 células /ml la cual se re suspendió en 10 ml de medio de cultivo celular. Se colocaron en la placa de 96 pocillos 200 µl de la suspensión celular y se dejó incubar la placa en incubadora (Thermo Scientific™, EEUU) con 5% de CO₂ a 37 °C con ambiente húmedo durante 5 días hasta visualizar la total formación de la monocapa. Una vez completada la monocapa celular, se retiró la mayor cantidad del medio de cultivo de cada uno de los pocillos (exceptuando los destinados a controles negativos) y se procedió a inocular 100 µl de cada una de las diluciones del virus (obtenidas previamente mediante una dilución 1:10 del virus en medio DMEM) con cinco repeticiones de cada una de éstas; Una vez inoculada la placa se dejó incubar durante una hora con agitación constante en incubadora a las condiciones antes mencionadas y finalmente se añadieron a cada pocillo 100 µl del medio de cultivo celular.

Los resultados de la titulación se determinan mediante observación del efecto citopático en cada pocillo. El cálculo de la dosis infectiva del 50 % en el cultivo de tejidos (TCID₅₀) se realizó empleando el método de Reed y Muench (Thrusfield, 2007).

4.6 Detección molecular de BoHV-1

La detección molecular de BoHV-1 se realizó a partir de cultivo celular infectado con la cepa viral empelada como control positivo.

4.7 Métodos de extracción de ADN

4.7.1 Método de fenol saturado

Se trataron 200 µL de sobrenadante de células infectadas con la cepa viral con SDS al 1% y proteinasa K (Sigma, EEUU) a 0,2 mg/mL de concentración final durante una hora a 56 °C en baño maría (BiogenicsLab, México). En paralelo se trataron 200 µL de sobrenadante de células no infectadas como control negativo. El sobrenadante tratado con SDS y proteinasa K se mezcló con 200 µL de fenol saturado con Tris 0.1M pH 8.0, no se dio vortex, se agitó en balanceo durante 10 minutos y se centrifugaron las muestras a 5 min a 12000 g. Se extrajo la fase acuosa donde está el DNA y se colocó en un tubo nuevo. El paso anterior se repitió hasta que no se observó turbidez en la fase acuosa. Posteriormente se mezcló con 200 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v), no se da vortex. Se agitó en balanceo durante 10 minutos y se centrifugó 5 minutos a 12000 g. Se extrajo el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo. Posteriormente se adicionó 500 µL de isopropanol frío, se homogenizó y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó durante 15 minutos a 12000 g. Se lavó el precipitado con etanol al 70% y se dejó secar al aire, después se resuspendió en 20-50 µL de tampón TE 1X. La concentración de ADN se determinó a partir de la densidad óptica leída a una longitud de onda de 260 nm y la pureza se determinó

por la relación de las densidades ópticas leídas a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Nanodrop 8000, EEUU). El material genético se conservó a – 80°C hasta el momento de su uso (Rodríguez, et al, 2007).

4.7.2 Método Chelex 100 sodium (Sigma, EEUU)

El proceso de extracción de ADN viral se realizó siguiendo las indicaciones descritas en el manual online de la OIE 2017 (http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.12_IBR_IPV.pdf ; Apartado 1.3.1.2, pg. 6).

4.7.3 Método empleando el Paquete de Extracción (Viral RNA/DNA Mini Kit)

El proceso de obtención de ADN viral se llevó a cabo empleando el juego de reactivos PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit, (Invitrogen EE.UU) siguiendo las instrucciones del fabricante (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_viral_rna_dna_man.pdf).

4.7.4 Método empleando el Paquete de Extracción (High Pure Viral Nucleic Acid Kit)

El proceso de obtención de ADN viral se llevó a cabo empleando el juego de reactivos High Pure Viral Nucleic Acid Kit, catálogo No. 11 858 874 001, siguiendo las instrucciones del fabricante (https://lifescience.roche.com/documents/High-Pure-Viral-Nucleic-Acid-Kit.pdf?_ga=2.149700146.581711487.1499982162-1139206569.1499982162).

4.7.5 Cuantificación del ADN

El ADN extraído mediante los protocolos descritos anteriormente, se cuantificó en el espectrofotómetro Nanodrop 8000 (Thermo Fisher Scientific; EEUU), para lo cual se colocaron 3 µl de agua DEPC en cada uno de los sensores del espectrofotómetro siguiendo los protocolos de operación del equipo. Posteriormente se colocaron 2 µl de cada uno de los tampones de elución como blanco antes de proceder a medir las muestras. Una vez cuantificadas las muestras se conservaron a -80 °C.

4.8 Cebadores

Los cebadores utilizados para los procesos de optimización de PCR fueron los reportados por Claus y colaboradores (Claus et al, 2005). Los cebadores amplifican un fragmento de ADN de 354 pb que pertenece al marco de lectura del gen de la glicoproteína C (gC) que forma parte de la estructura del virus causante de la Rinotraqueitis infecciosa bovina. Las secuencias génicas utilizadas para la amplificación de la región gC fueron: B1-F (5'-CAA CCG AGA CGG AAA GCT CC-3') y Bcon-R (5'-AGT GCA CGTACA GCG GCT CG-3').

4.9 Protocolo estándar de amplificación génica

El primer ensayo para la estandarización de la PCR se realizó adaptando el protocolo de Claus y colaboradores (2005), a las condiciones del laboratorio de Biología Molecular en Agrocalidad. Los reactivos empleados fueron los siguientes: tampón PCR green Flexi (Promega, EEUU), cloruro de magnesio (Invitrogen, EEUU), dNTPs (Invitrogen, EEUU), DMSO (Thermo Fisher Scientific, EEUU) y la enzima Go Taq Hot start (Promega, EEUU) como se puede observar en la Tabla 1. Por otra parte, en la Tabla 2 se puede observar el proceso de amplificación genética utilizado en el termociclador.

Tabla1.

Concentración de reactivos y volumen de la mezcla de reacción.

| REACTIVO | [] Inicial | [] Final | Vol. X 1(μL) |
|-----------------------|--------------------|------------------|---------------------|
| H ₂ O | | | 25.15 |
| <i>Green GoTaq®</i> | 5x | 1x | 10 |
| <i>Flexi Buffer</i> | | | |
| MgCl ₂ | 25 mm | 1.5mm | 3 |
| dNTPs | 10mm | 0.2mm | 1 |
| Cebador b1-f | 25μm | 0.4 μm | 0.8 |
| Cebador bcon-r | 25μm | 0.4 μm | 0.8 |
| DMSO | | 8% | 4 |
| <i>GoTaq® Flexi</i> | 5u/ μl | 1.25u/50μl | 0,25 |
| <i>DNA Polymerase</i> | | | |
| TOTAL | | | 45 |

Tabla 2.

Programa empleado para la amplificación del gen de la glicoproteína C (gC) (94°C para la desnaturalización, 94/58/72°C para el anillaje y 72°C de extensión).

| Ciclo | Temperatura | Tiempo |
|--------------|--------------------|---------------|
| 1 | 94°C | 3min |
| 40 ciclos | 94 | 1min |
| | 58 | 1min |
| | 72 | 1min |
| 1 | 72°C | 7min |
| Final | 4°C | ∞ |

4.9.1 Verificación de la integridad del ADN

Treinta días después del primer ensayo de amplificación génica con el protocolo estándar, se realizó un nuevo ensayo para determinar el nivel de degradación del ADN extraído con cada uno de los protocolos descritos previamente. Adicionalmente, se determinó el grado en el que afecta al proceso de amplificación génica la ausencia de DMSO en la reacción.

4.9.2 Optimización de la temperatura de anillado.

Con el fin de optimizar la reacción de amplificación se realizó un ensayo con un gradiente de temperaturas. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (Bio-rad, EEUU) en las siguientes condiciones.

Tabla 3.

Gradiente de temperaturas de hibridación.

| Ciclo | Temperatura | Tiempo |
|--------------|--------------------|---------------|
| 1 | 94°C | 3min |
| 40 ciclos | 94 | 1min |
| | GRAD | 1min |
| | 72 | 1min |
| 1 | 72°C | 7min |
| Final | 4°C | ∞ |

* GRAD: Gradiente 54; 56; 58; 60; 62; 64 °C

4.9.3 Optimización de la concentración de cebadores

El proceso de optimización de la concentración de los cebadores consistió en la preparación de una mezcla de reacción mediante la dilución de los cebadores de una concentración inicial de 25 μM a 10 μM y de la variación de la concentración final de 0.08 a 0.20 μM con intervalos consecutivos de 0,4 μM (Tabla 4).

Posteriormente la mezcla de reacción se dispensó en cuatro microtubos de centrifuga (Eppendorf®, EEUU) a los cuales se les completó el volumen con agua DEPC y las diferentes concentraciones de cebadores (Tabla 5). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 45 μ L.

Tabla 4.

Concentración de reactivos en la mezcla.

| Reactivo | [] Inicial | [] Final | Vol. X 1(μl) |
|---------------------|--------------------|------------------|------------------------------------|
| H ₂ O | | GRAD | |
| <i>Green GoTaq®</i> | 5X | 1X | 10 |
| <i>Flexi Buffer</i> | | | |
| MgCl ₂ | 25 mM | 1.5mM | 3 |
| dNTPs | 10mM | 0.2mM | 1 |
| Cebador b1-f | 10 μ M | GRAD | |
| Cebador bcon-r | 10 μ M | GRAD | |
| DMSO | | 8% | 4 |
| <i>GoTaq® Flexi</i> | 5U/ μ l | 1.25u/50 μ L | 0,25 |
| <i>DNA</i> | | | |
| <i>Polymerase</i> | | | |
| TOTAL | | | 18,25 |

Tabla 5.

Gradiente de concentración de los cebadores

| | 0.08 μM | 0.12 μM | 0.16 μM | 0.2 μM |
|------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| H ₂ O | 24.75 | 23.75 | 22.75 | 21.75 |
| Cebador B1-f | 1 | 1.5 | 2 | 2.5 |
| Cebador Bcon-R | 1 | 1.5 | 2 | 2.5 |

4.9.4 Optimización de la concentración de cloruro de magnesio

El protocolo de estandarización de $MgCl_2$ consistió en la variación del reactivo de una concentración de 1 mM hasta 3mM con intervalos consecutivos de 0,5 mM. El proceso se llevó a cabo en cinco microtubos de centrifuga (Eppendorf®, EEUU) y a cada uno se le colocó una concentración distinta del reactivo a estandarizar (Tabla 6 y Tabla 7).

Tabla 6.

Gradiente de concentración de $MgCl_2$

| Reactivo | [] Inicial | [] Final | Vol. X 1(μl) |
|-----------------------|-------------|-------------|--------------|
| H ₂ O | | GRAD | |
| <i>Green GoTaq®</i> | 5X | 1X | 10 |
| <i>Flexi Buffer</i> | | | |
| MgCl ₂ | 25 mM | GRAD | |
| dNTPs | 10mM | 0.2mM | 1 |
| Cebador b1-f | 10μM | 0.2 μM | 2.5 |
| Cebador bcon-r | 10μM | 0.2 μM | 2.5 |
| DMSO | | 8% | 4 |
| <i>GoTaq® Flexi</i> | 5U/ μl | 1.25u/50μL | 0,25 |
| <i>DNA Polymerase</i> | | | |
| TOTAL | | | 20.25 |

Tabla 7.

Variación en el volumen y concentración final de $MgCl_2$

| | 1 mM | 1.5 mM | 2 mM | 2.5 mM | 3 mM |
|-------------------|-------|--------|-------|--------|-------|
| H ₂ O | 22.75 | 21.75 | 20.75 | 19.75 | 18.75 |
| MgCl ₂ | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |

4.9.5 Electroforesis y visualización de amplicones

La visualización de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa (Invitrogen, EEUU) al 2%, siguiendo los protocolos estandarizados en el laboratorio de biología molecular de Agrocalidad. El tamaño de banda esperado para la amplificación del gen de la glicoproteína C (gC) es de 354 pb.

4.9.6 Sensibilidad analítica

4.9.6.1 Inoculación de ADN viral en medio de cultivo celular DMEM

El proceso se realizó partiendo de una concentración inicial de ADN viral de 590 ng/ μ L (concentración obtenida al segundo pase del virus en células de testículo de ternero como lo recomienda APHIS, EEUU) he inoculando directamente en el medio de cultivo celular DMEM, para ello se realizaron cinco diluciones seriadas 1:10 (180 μ L de DMEM y 20 μ L de ADN viral) de las cuales se obtuvieron concentraciones de ADN viral de 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 ng. Posteriormente se realizó la extracción de ADN para cada una de las diluciones y se procedió a la amplificación génica para determinar los límites de detección en ésta matriz. Este ensayo se llevó a cabo con el método previamente descrito por Claus y colaboradores (2005) y con los parámetros modificados en esta investigación.

4.9.6.2 Inoculación de ADN viral en células de tejido epitelial

El proceso se realizó partiendo de una concentración inicial de ADN viral de 590 ng/ μ L (concentración obtenida al segundo pase del virus en células de testículo de ternero como lo recomienda APHIS, EEUU) he inoculando directamente en el medio de cultivo celular DMEM en presencia de células de tejido epitelial, previamente obtenidas por maceración de 0,6 g de tejido en 6 mL de DMEM, para ello se realizaron cinco diluciones seriadas 1:10 (180 μ L de DMEM y 20 μ L de ADN viral) de las cuales se obtuvieron concentraciones de ADN viral de 10, 1, 0.1,

0.01 y 0.001 ng. Posteriormente se realizó la extracción de ADN para cada una de las diluciones y se procedió a la amplificación génica para determinar los límites de detección en ésta matriz. Este ensayo se llevó a cabo con el método previamente descrito por Claus y colaboradores (2005) y con los parámetros modificados en esta investigación.

4.9.1.3 Inoculación de ADN viral en Semen

El proceso se realizó partiendo de una concentración inicial de ADN viral de 590 ng/ μ L (concentración obtenida al segundo pase del virus en células de testículo de ternero como lo recomienda APHIS, EEUU) he inoculando directamente en células reproductivas (semen), para ello se realizaron cinco diluciones seriadas 1:10 (180 μ L de DMEM y 20 μ L de ADN viral) de las cuales se obtuvieron concentraciones de ADN viral de 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 ng. Posteriormente se realizó la extracción de ADN para cada una de las diluciones y se procedió a la amplificación génica para determinar los límites de detección en ésta matriz. Este ensayo se llevó a cabo con el método previamente descrito por Claus y colaboradores (2005) y con los parámetros modificados en esta investigación.

4.9.7 Sensibilidad específica

4.9.7.1 Inoculación de sobrenadante viral en medio de cultivo celular DMEM

El proceso se realizó colocando el sobrenadante obtenido del proceso de replicación viral en células de testículo de ternero con una concentración aproximada de 1700 TCID₅₀/100 μ L (dosis infectiva calculada partiendo de las recomendaciones de APHIS, EEUU), directamente en medio de cultivo celular DMEM. Se realizaron ocho diluciones seriadas 1:10 (180 μ L de DMEM y 20 μ L de sobrenadante viral) de las cuales se obtuvieron concentraciones aproximadas de virus de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , TCID₅₀, 10^{-7} . Posteriormente se realizó la extracción de ADN para cada una de las diluciones y se procedió a la

amplificación génica para determinar los límites de detección en ésta matriz. Este ensayo se llevó a cabo con el método previamente descrito por Claus y colaboradores (2005) y con los parámetros modificados en esta investigación.

4.9.7.2 Inoculación del sobrenadante viral en células de tejido epitelial

El proceso se realizó colocando el sobrenadante obtenido del proceso de replicación viral en células de testículo de ternero con una concentración aproximada de 1700 TCID₅₀/100µL (dosis infectiva calculada partiendo de las recomendaciones de APHIS, EEUU), directamente en medio de cultivo celular DMEM con células de tejido epitelial. Se realizaron ocho diluciones seriadas 1:10 (180 µL de DMEM y 20 µL de sobrenadante viral) de las cuales se obtuvieron concentraciones aproximadas de virus de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, TCID₅₀, 10⁻⁷. Posteriormente se realizó la extracción de ADN para cada una de las diluciones y se procedió a la amplificación génica para determinar los límites de detección en ésta matriz. Este ensayo se llevó a cabo con el método previamente descrito por Claus y colaboradores (2005) y con los parámetros modificados en esta investigación.

4.9.7.3 Inoculación de sobrenadante viral en Semen

El proceso se realizó colocando el sobrenadante obtenido del proceso de replicación viral en células de testículo de ternero con una concentración aproximada de 1700 TCID₅₀/100µL (dosis infectiva calculada partiendo de las recomendaciones de APHIS, EEUU), directamente en células reproductivas (semen). Se realizaron ocho diluciones seriadas 1:10 (180 µL de DMEM y 20 µL de sobrenadante viral) de las cuales se obtuvieron concentraciones aproximadas de virus de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, TCID₅₀, 10⁻⁷. Posteriormente se realizó la extracción de ADN para cada una de las diluciones y se procedió a la amplificación génica para determinar los límites de detección en ésta matriz. Este ensayo se llevó a cabo con el método previamente descrito por Claus y

colaboradores (2005) y con los parámetros modificados en esta investigación.

4.10 Determinación de especificidad

Se realizó un ensayo de PCR utilizando ADN proveniente de una cepa de origen viral (Herpesvirus bovino tipo II) y dos cepas bacterianas (*Campilobacter fetus fetus* y *Leptospira*) que infectan al ganado bovino; para determinar la especificidad de los cebadores empleados para la amplificación del gen de la glicoproteína C (gC) del IBR y garantizar que no sean capaces de amplificar secuencias génicas de otros microorganismos presentes en las muestras clínicas.

5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Cultivo celular y aislamiento viral

El cultivo primario de testículo de ternero se mantuvo durante diez días de incubación a 37 °C en ambiente húmedo en incubadora con 5% de CO₂, este ambiente de cultivo es reportado por la mayoría de estudios en los que el objetivo es la replicación viral de herpesvirus bovino tipo I (Thiry et al, 2006; Wang et al, 2006; Vogel et al, 2004; Van Engelenburg, 1995). El 100% de confluencia de células se obtuvo al décimo día en frascos de cultivo celular de 75 ml (Figura 12), el proceso de crecimiento de los cultivos primarios varía dependiendo de la concentración de suero fetal bovino (SFB) y caldo soja tripticasa utilizado en el medio como se refiere en los trabajos de (Ruiz et al, 2008; Schynts et al, 2003; Thiry et al, 1987) donde la variación de la concentración de SFB entre un 5% y 10% influye directamente en el tiempo de crecimiento y confluencia de las células en el frasco de cultivo, así como la concentración de células inoculadas.

La disgregación celular se realizó con tripsina 0,05% suplementada con EDTA 4N como se sugiere en las investigaciones realizadas por (Carbonero et al, 2011; Blickenstorfer et al, 2010; Bratanich et al, 1991); se puede aumentar la eficacia de

la disgregación incubando los frascos por 3 minutos a 37 °C o manteniendo la solución a esta temperatura, sin embargo, el proceso puede ser realizado únicamente con tripsina aumentando su concentración al 1% e incubando los frascos a 37°C por un tiempo de 3 a 5 minutos como se describe en la investigación de (Deka et al, 2005; Lovato et al, 2003). Se realizaron dos pases de las células ya adaptadas a frascos de 25 ml en los cuales se inoculó la cepa control de BoHV-1.

El proceso de infección viral se realizó con éxito en el cultivo primario de células de testículo de ternero, sin embargo en trabajos similares se emplean líneas celulares comerciales como MDBK para la replicación viral. Según los resultados observados en esta investigación, la diferencia entre ambos tipos celulares radica básicamente en la facilidad de adaptación a las condiciones de crecimiento en medio de cultivo, la generación de clones y la capacidad de proliferar indefinidamente (en cuanto a líneas celulares se refiere) sin embargo centrándonos en la eficiencia del virus al momento de infectar las células, la diferencia entre cultivos no es significativa aunque se debe tomar en cuenta que en cultivos primarios el riesgo de contaminación es alto, por ende los procesos de control ambiental, sanidad de espacios y limpieza deben ser de principal importancia (Carbonero et al, 2011; Blickenstorfer et al, 2010; Bracho et al, 2006).



Figura 12. Cultivo primario de células de testículo de ternero a los diez días de crecimiento en medio DMEM de cultivo celular.

Tras la inoculación de la cepa viral control se observó el efecto citopático en la monocapa de células de testículo de ternero a los diferentes tiempos de inoculación (Figura 14, 15 y 16), se logró identificar los sincitios generados por el virus y el modo de acción de éste sobre las células del cultivo primario. Este efecto es similar al observado en los trabajos realizados por (Domínguez, 2009; Deka et al, 2005). Aunque estos autores no utilizaron cultivos primarios para sus investigaciones, el comportamiento del virus es el mismo; por otro lado, se ha determinado que el efecto citopático puede ser observado a partir de las dos horas de inoculación del virus como lo describe (Ellis et al, 2005; Kahrs, 2001). En la presente investigación se establecieron los tiempos de observación a las 24, 48 y 72 horas debido a las especificaciones de la Entidad Gubernamental “APHIS” en las cuales se recomienda observar el efecto citopático hasta tres días después de la inoculación. Pasados los tres días, se realizó la disrupción celular por medio de la congelación y descongelación del frasco a $-80^{\circ}\text{C}/37^{\circ}\text{C}$, se repitió este proceso tres veces con el objeto liberar la mayor cantidad de virus al medio de cultivo (Chaparro, 2003) y se efectuaron nuevos pases en cultivo celular primario de testículo de ternero.

Lata, 2006 menciona en su investigación que el efecto citopático en células MDBK, la formación de sincitios y el tiempo en el que estos efectos se pueden observar dependen específicamente del estado del virus al momento de la inoculación, la concentración de la dosis infectiva y la adaptación de del virus a las células, más no a la procedencia de estas o los métodos utilizados para su obtención.



Figura 14. Efecto citopático producido por el virus BoHV-1 a las 24 horas de inoculación viral en células de testículo de ternero cultivadas en medio DMEM.

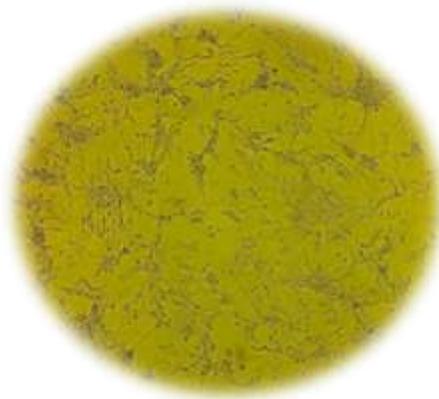


Figura 15. Efecto citopático producido por el virus IBR a las 48 horas de inoculación viral en células de testículo de ternero cultivadas en medio DMEM.

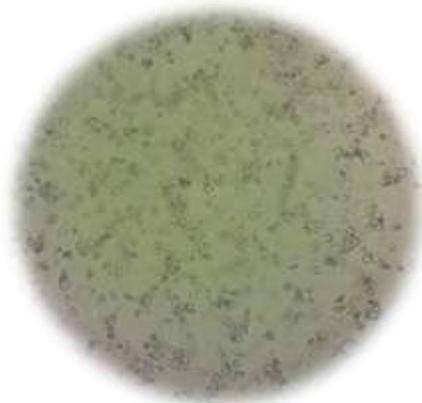


Figura 16. Efecto citopático producido por el virus IBR a las 72 horas de inoculación viral en células de testículo de ternero cultivadas en medio DMEM

5.2 Conteo celular y titulación viral

El proceso de conteo de las células de testículo de ternero se realizó en una cámara de Neubauer a partir de una suspensión celular obtenida mediante disrupción celular (Figura 17), el cálculo de la concentración de células se realizó utilizando la ecuación descrita en el apartado 4.2.3. Un número aproximado de células de testículo de ternero (10^6 células/ml) se inoculó en una placa de 96 pocillos. Debido a que las células se encuentran adaptadas al medio, el 100% de confluencia celular en la placa se obtuvo a las 24 horas de inoculación. Según (Bush et al, 2008) el tiempo de formación de la monocapa disminuye representativamente, en relación con el tiempo que demora el crecimiento al primer pase, debido al proceso de adaptación que sufren las células. En este punto las concentraciones de suero fetal bovino se pueden disminuir y en promedio, el número de pases que pueden realizarse varían entre 10 a 12 dependiendo de las condiciones del tejido inicial utilizado en la extracción de las células, concentraciones celulares y los suplementos usados en el medio de cultivo entre otros.

El virus control cultivado en células de testículo de ternero se tituló y se obtuvo un efecto citopático hasta la dilución $1 \times 10^{6,23}$ (TCID₅₀) (Figura 18) calculada por medio de la técnica de Reed y Muech (1937). Según (Vera et al, 2008) las cepas aisladas de lavados prepucales y vaginales tituladas en su trabajo de investigación mostraron un TCID₅₀ de $1 \times 10^{5,15}$ y $1 \times 10^{5,62}$ respectivamente, sin embargo la cepa control utilizada en el mismo trabajo tuvo un TCID₅₀ de $1 \times 10^{5,25}$ si comparamos estos resultados con los obtenidos en el presente proyecto de investigación podemos observar que las diferencias entre ambos resultados radican en la adaptación del virus al medio, el tiempo de cultivo y la dosis infectiva inicial inoculada.

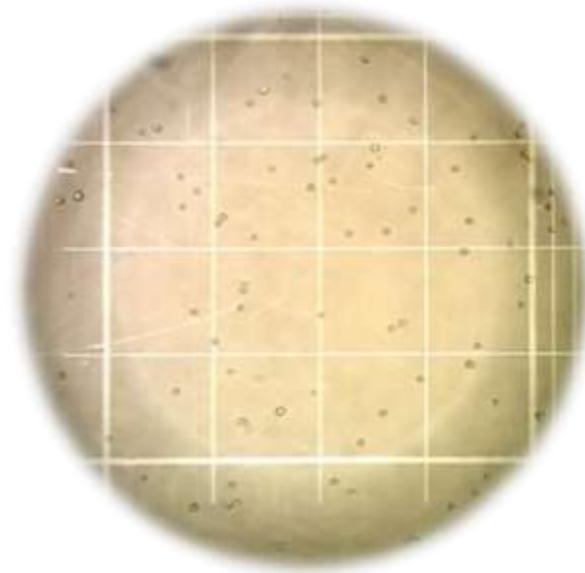


Figura 17. Conteo de células en cámara de Neubauer

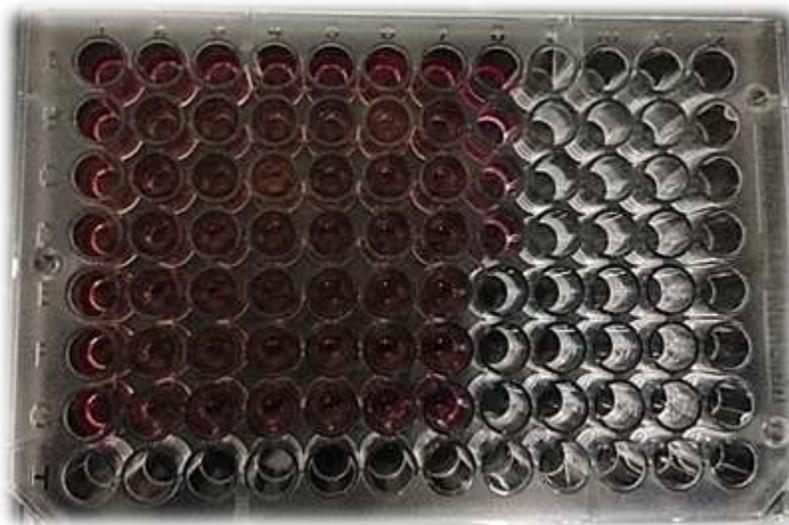


Figura 18. Titulación viral en placa de 96 pocillos.

5.3 Comparación de diferentes métodos de extracción de ADN

En la Tabla 1 se pueden observar las absorbancias a 260 y 280 nm obtenidas en el espectrofotómetro, además del ADN derivado por los diferentes métodos de extracción y la pureza conseguida empleando cada método, con lo cual se puede evidenciar que el método que presenta mayor pureza es el del paquete de

extracción High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Alemania). El cual será utilizado para ensayos posteriores.

Tabla 1.

Obtención de ADN viral (BoHV-1) por varios métodos de extracción.

| Herpesvirus tipo 1 (BoHV-1) | | | | | |
|------------------------------------|--------------------|------------|----------------|----------------|--------------------------|
| Método de Extracción | Absorbancia | | | | [] ADN ng/μL |
| | 260 | 280 | 260/280 | 260/230 | |
| Fenol saturado | 10,36 | 5,27 | 1,97 | 2,10 | 518,10 |
| Chelex 100 sodium | 10,98 | 5,73 | 1,91 | 1,43 | 548,80 |
| Viral RNA/DNA Mini Kit | 1,03 | 0,48 | 2,16 | 0,22 | 51,47 |
| Kit High Pure Viral Nucleic Acid | 4,42 | 1,372 | 3,22 | 2,77 | 221,00 |

El proceso de extracción de ácido nucleico se realizó con éxito utilizando los cuatro métodos de obtención de ADN viral. Las diferencias obtenidas radican en que con los dos primeros métodos de extracción (Fenol saturado y Chelex sodium) se obtuvo ADN genómico, mientras que con los dos últimos métodos (Invitrogen y Roche), al ser paquetes de extracción comerciales, tienen pasos adicionales que permiten obtener una concentración superior de ADN viral.

El método descrito por Rodríguez et al, 2007 empleando el fenol saturado fue empleado en este trabajo de investigación debido a que es uno de los métodos más utilizados y reportados (Kennedy et al, 2014) para extracción de ADN viral en BoHV-1. Además, los reactivos utilizados para la extracción son de bajo costo, sin embargo el tiempo empleado en el proceso de purificación del ADN es mayor y debido a que se utilizan solventes orgánicos (fenol y/o cloroformo), los residuos de éstos pueden interferir en la PCR (Vega et al, 2008). Cabe mencionar que, la resina Chelex 100 se utilizó debido a que se encuentra reportada en el manual de la OIE 2017 como método estándar para la obtención de ADN viral y para la detección mediante PCR de BoHV-1 (manual online de la OIE 2017;

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.12_IBR_IPV.pdf ; Apartado 1.3.1.2, pg. 6).

En cuanto a los métodos de extracción utilizados, adquiridos a casas comerciales se puede mencionar que el Paquete de Extracción Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen, EEUU) es empleado en varias investigaciones previas (Coolen, 2011; Yuan et al, 2012; Forsberg et al, 2012) con el fin de extraer el ADN de patógenos que afectan a los humanos, o en su defecto, analizar muestras directas de sangre o tejido animal con el fin de extraer ADN viral con un nivel de pureza superior al utilizado en otros protocolos. Sin embargo, en el proceso de purificación intervienen solventes orgánicos que, al igual que Fenol saturado, pueden afectar o alterar el proceso de amplificación génica. Por otra parte, el Paquete de extracción High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Alemania) posee varias características que lo señalan como el más factible en los procesos de extracción, debido a que el ADN es absorbido en una membrana de sílica incorporada en columnas de extracción (al igual que en el Paquete de extracción de Invitrogen), la casa comercial recomienda en el proceso una secuencia de lavados en los cuales se remueven contaminantes celulares y sales caotrópicas que promueven la desnaturalización de las proteínas; es un proceso más rápido y simple que los métodos que emplean solventes orgánicos pero su costo, a diferencia de los otros métodos de extracción es alto (Humann et al, 2009; Claassen et al, 2013).

5.4 Protocolo estándar de amplificación génica

En la Figura 19 se pueden observar los productos de PCR a partir del ADN obtenido mediante los cuatro diferentes métodos de extracción utilizando el protocolo de Claus et al, 2005 adaptado a las condiciones del laboratorio de Biología Molecular de Agrocalidad. Se determinó que el amplicón obtenido por el método del Paquete de extracción Kit High Pure Viral Nucleic Acid (Roche, Alemania) se obtuvo una banda más robusta y de mayor calidad, que será

utilizada en los posteriores ensayos para la estandarización de los parámetros de amplificación.

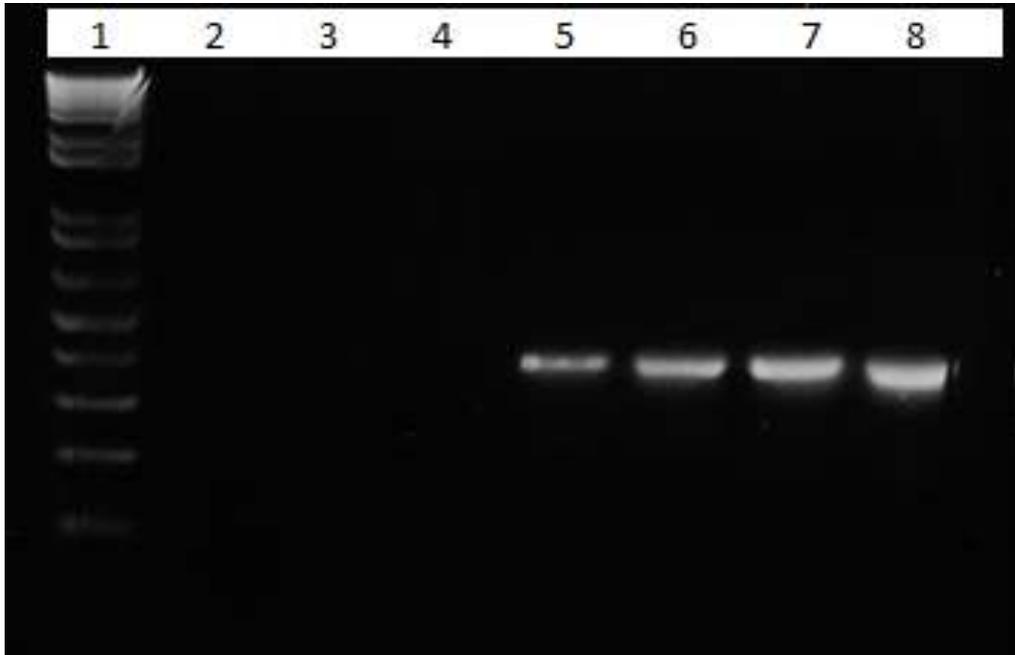


Figura 19. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% del producto de PCR específico para el fragmento de 354 pb promotor del gen gC.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb
- b) Carril 2: Control negativo de células de testículo de ternero
- c) Carril 3: Control negativo con agua DEPC
- d) Carril 4: Espacio en blanco
- e) Carril 5: Amplicón de 354 pb utilizando ADN obtenido por el método de Fenol Saturado
- f) Carril 6: Amplicón de 354 pb utilizando ADN obtenido por el método de Chelex 100 Sodium
- g) Carril 7: Amplicón de 354 pb utilizando ADN obtenido por el Juego de Extracción (Viral RNA/DNA Mini Kit) (Invitrogen, EEUU)
- h) Carril 8: Amplicón de 354 pb utilizando ADN obtenido por el Juego de Extracción (High Pure Viral Nucleic Acid Kit) (Roche, Alemania)

5.5 Integridad del ADN e importancia del DMSO en PCR

Para determinar la integridad del ADN se realizó un ensayo comparativo transcurridos 30 días de la extracción de ADN viral, debido a que el diagnóstico diferencial de IBR en la Agencia de Aseguramiento de la Calidad del Agro-AGROCALIDAD no puede ser realizado en un tiempo mayor de ocho días; se tomó como tiempo máximo de conservación del ADN viral 30 días a -80°C para su utilización en el protocolo de PCR. Por otro lado, en trabajos realizados por (Dias et al, 2006 y Jones, 2003) se logró determinar que la temperatura idónea para mantener el ADN sin degradación es -80°C y que a esta temperatura la conservación se puede extender durante años sin ocasionar daño en la integridad del ADN. Por otra parte, podemos observar que no existe amplificación en el carril correspondiente a la extracción empelando el método del Fenol saturado (Figura 12), lo que indica que la degradación del ADN con este método es mayor en comparación con los otros métodos empleados. La comprobación de este resultado se repitió tres veces de esta forma se confirmó el resultado.

Al mismo tiempo que se realizó la amplificación génica con la PCR estándar, se realizó un ensayo simultaneo sin añadir DMSO a la reacción y como se puede observar en la Figura 20, no se obtuvieron bandas de amplificación en el gel.

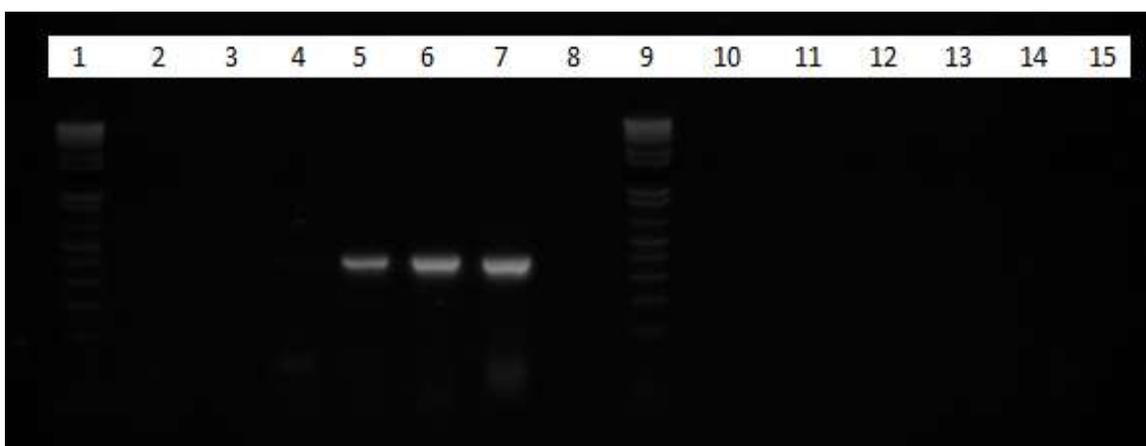


Figura 20. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% del producto de PCR específico para el fragmento de 354 pb promotor del gen gC.

- a) Carril 1 y 9: Marcador de peso molecular de 1 Kb
- b) Carril 2 y 10: Control negativo de células de testículo de ternero
- c) Carril 3 y 11: Control negativo con agua DEPC
- d) Carril 4 y 12: Amplicón de 354 pb utilizando ADN obtenido por el método de Fenol Saturado
- e) Carril 5 y 13: Amplicón de 354 pb utilizando ADN obtenido por el método de Chelex 100 Sodium
- f) Carril 6 y 14: Amplicón de 354 pb utilizando ADN obtenido por el Juego de Extracción (Viral RNA/DNA Mini Kit) (Invitrogen, EEUU)
- g) Carril 7 y 15: Amplicón de 354 pb utilizando ADN obtenido por el Juego de Extracción (High Pure Viral Nucleic Acid Kit) (Roche, Alemania)

Debido a que el DMSO es un compuesto organosulfurado con alta polaridad y alta constante dieléctrica, es capaz de interrumpir la formación de la estructura secundaria del ADN molde. Es sabido que el DMSO se une al hidrógeno a las ranuras del ADN molde, y como resultado desestabiliza la estructura de doble hélice (Hardjasa et al, 2010). Esto es particularmente útil en ADN molde con alto contenido en GC ya que al aumentar la resistencia al enlace de hidrógeno, aumenta la dificultad de desnaturalizar al ADN molde y hace que las estructuras

secundarias intermoleculares se formen más fácilmente, lo que ayuda al momento de unirse los cebadores al ADN molde (Hardjasa et al, 2010). Así, la adición de DMSO puede mejorar en gran medida los rendimientos y las especificidades de las reacciones de los cebadores en la PCR (Hardjasa et al, 2010). La importancia de adicionar este reactivo para la amplificación de fragmentos de ADN viral de la familia *Herpesvirinae* ha sido reportada por varios autores (Claus et al, 2005; Rodriguez et al, 2007 y Cândido et al, 2000) y en este trabajo de investigación, se corrobora dicha afirmación. La comprobación de este resultado se repitió tres veces más, con el fin de confirmar el resultado.

5.6 Optimización de la temperatura de hibridación

La temperatura de hibridación reportada por Claus et al, 2005 utilizada en los protocolos anteriores (Figura 19 y 20) fue de 58 °C y debido a que (Deka et al, 2005; Moore et al, 2000 y Wu et al, 1991) indican que las temperaturas superiores a 62°C no son adecuadas para el proceso de amplificación y que depende del porcentaje de GC presentes en las secuencias de los cebadores para determinar la temperatura óptima de anillaje, se realizó un gradiente de temperaturas desde 54°C hasta los 64°C con intervalos consecutivos de 2°C y se obtuvieron los resultados que pueden ser visualizados en la Figura 21. Debido a que no se observó diferencia significativa entre cada una de las temperaturas, seleccionamos la temperatura reportada por Claus et al, 2005 de 58°C la cual fue estandarizada con muestras clínicas.

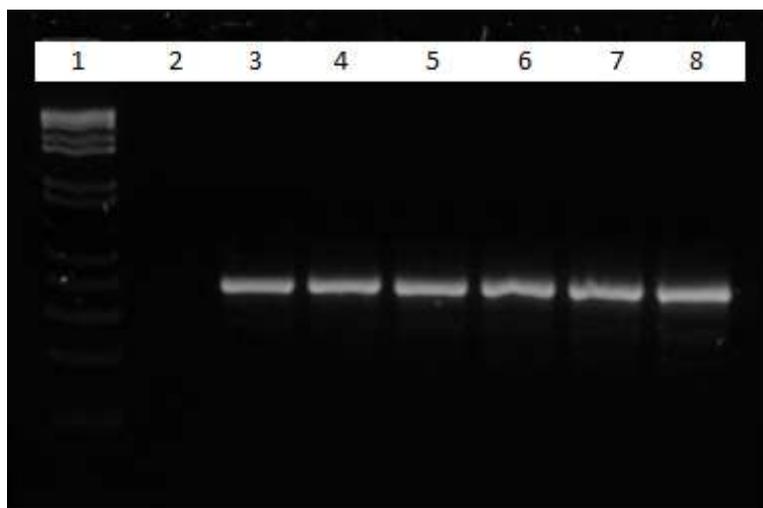


Figura 21. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% del producto de PCR específico para el fragmento de 354 pb promotor del gen gC.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb
- b) Carril 2: Control negativo con agua DEPC
- c) Carril 3: Amplicón de 354 pb obtenido a 54 °C
- d) Carril 4: Amplicón de 354 pb obtenido a 56 °C
- e) Carril 5: Amplicón de 354 pb obtenido a 58 °C
- f) Carril 6: Amplicón de 354 pb obtenido a 60 °C
- g) Carril 7: Amplicón de 354 pb obtenido a 62 °C
- h) Carril 8: Amplicón de 354 pb obtenido a 64 °C

5.7 Optimización de la concentración de cebadores

En la Figura 22 se muestra el ensayo del gradiente de concentración de los cebadores y se pudo determinar qué a una concentración de 0,2 μ M se obtiene una banda óptima y con características plausibles enfocados en el trabajo de investigación. Para los ensayos posteriores de amplificación se seleccionó una concentración final de 0,2 μ M de cebadores.

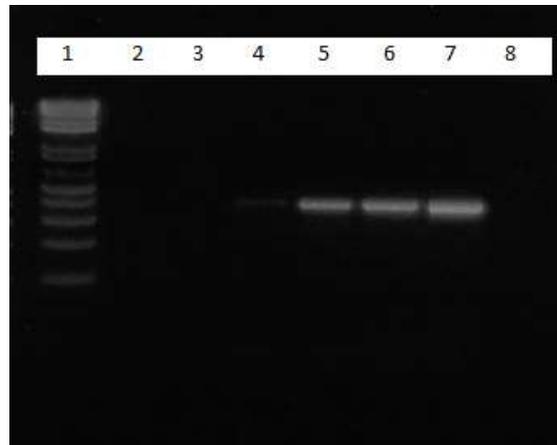


Figura 22. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% del producto de PCR específico para el fragmento de 354 pb promotor del gen gC.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb
- b) Carril 2: Control negativo con agua DEPC
- c) Carril 3: Espacio vacío
- d) Carril 4: Amplicón de 354 pb obtenido a 0,08 μM de concentración final de cebadores
- e) Carril 5: Amplicón de 354 pb obtenido a 0,12 μM de concentración final de cebadores
- f) Carril 6: Amplicón de 354 pb obtenido a 0,16 μM de concentración final de cebadores
- g) Carril 7: Amplicón de 354 pb obtenido a 0,20 μM de concentración final de cebadores

Claus et al, 2005 utilizan una concentración de cebadores inicial de 25 μM y una concentración final de 0,4 μM . Partiendo de estos datos se realizó una dilución de la concentración inicial a 10 μM y la concentración final para el proceso de optimización varió desde 0,08 μM a 0,2 μM con intervalos consecutivos de 0,04 μM . Según (Rola et al, 2005; Yason et al, 1995 y Wu et al, 1991) la concentración de los cebadores puede variar de acuerdo al nivel de especificidad, porcentaje de GC y tipo de muestra a ser analizada. En el proceso de unión de estas secuencias al ADN genómico influyen el nivel de inhibidores presentes en las muestras, la temperatura de anillaje utilizada y la concentración de MgCl_2 . Sin embargo, se debe tomar en cuenta que en datos reportados por el autor que diseñó los cebadores (Claus et al, 2005) utilizados en este trabajo de investigación, recomienda utilizar un nivel considerable de cebadores debido a que las muestras

clínicas contienen cargas virales mínimas y por ende el análisis diagnóstico muchas veces resulta negativo. Cabe recalcar que el análisis de los límites de detección representa un aspecto fundamental en los procesos de estandarización y de estos depende el correcto diagnóstico de enfermedades de importancia sanitaria.

5.8 Optimización de la concentración de cloruro de magnesio

En la figura 23 se puede observar que la variación de la concentración de $MgCl_2$ no afecta de forma significativa el proceso de amplificación por lo que, la concentración seleccionada para los ensayos ulteriores fue 1,5 mM de concentración final.

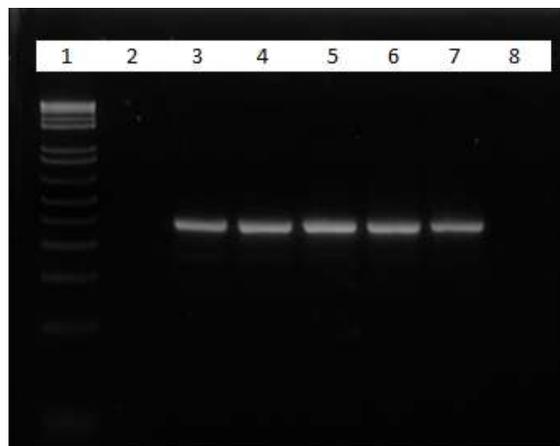


Figura 23. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% del producto de PCR específico para el fragmento de 354 pb promotor del gen gC.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb
- b) Carril 2: Control negativo con agua DEPC
- c) Carril 3: Amplicón de 354 pb obtenido a 1 mM de concentración final de $MgCl_2$
- d) Carril 4: Amplicón de 354 pb obtenido a 1.5 mM de concentración final de $MgCl_2$
- e) Carril 5: Amplicón de 354 pb obtenido a 2 mM de concentración final de $MgCl_2$
- f) Carril 6: Amplicón de 354 pb obtenido a 2.5 mM de concentración final de $MgCl_2$
- g) Carril 7: Amplicón de 354 pb obtenido a 3 mM de concentración final de $MgCl_2$

La concentración de cloruro de magnesio es uno de los factores cruciales en el proceso de amplificación génica, debido a que interviene directamente en el funcionamiento de la enzima Taq polimerasa. El magnesio es imprescindible para la PCR ya que los niveles actúan como cofactor de la enzima. El mecanismo de acción de este compuesto reside en que actúa como un catalizador de la reacción; cabe recalcar que el magnesio no es consumido durante la reacción pero esta no se lleva a cabo en ausencia del mismo (Yason et al, 1995 y Wu et al, 1991). Dentro de los rangos utilizados en la reacción, cabe mencionar que a mayor concentración de $MgCl_2$, se reduce el nivel de especificidad en la reacción debido a que los cebadores amplifican secuencias no específicas generando errores en la replicación. Por otro lado, las bajas concentraciones de $MgCl_2$ impiden la unión de los cebadores a la secuencia lo que resulta en la ausencia de la banda esperada.

5.9 Sensibilidad analítica

5.9.1 Inoculación de ADN viral en medio de cultivo celular DMEM

En la Figura 24 se pueden observar los productos de la reacción de las diluciones seriadas y el nivel de degradación del ADN presente en este ensayo, con lo cual se evidencia una banda íntegra y se puede concluir que no existe degradación significativa del ADN blanco, debido a que al utilizar medio de cultivo celular (DMEM) que viene con un nivel alto de esterilidad, podemos controlar el nivel de degradación directa del ADN. Se determinó que la reacción estandarizada detectó una cantidad aproximada de 0,1 ng de ADN viral en medio de cultivo celular DMEM.

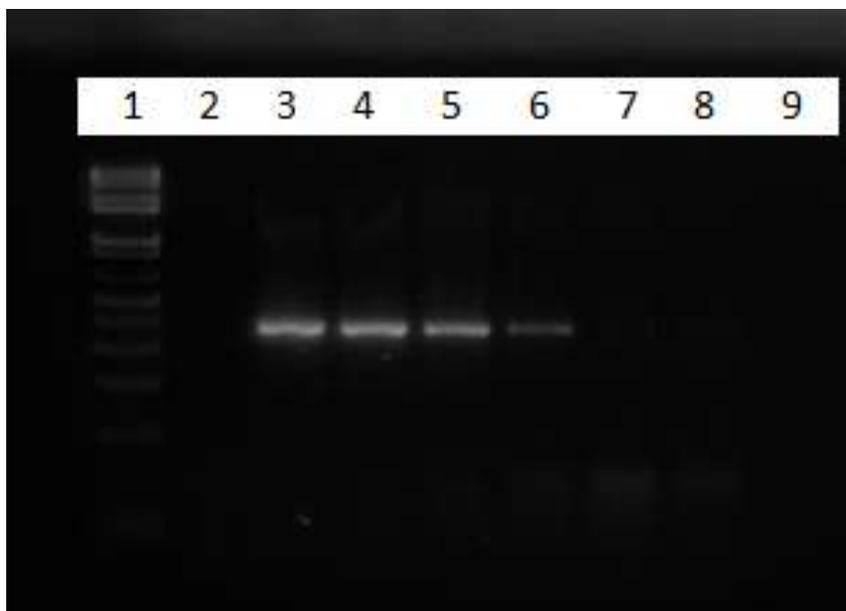


Figura 24. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% del producto de PCR específico para el fragmento de 354 pb promotor del gen gC.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb
- b) Carril 2: Control negativo con agua DEPC
- c) Carril 3: Control Positivo
- d) Carril 4: Amplicón de 354 pb obtenido a 10 ng de concentración de ADN viral
- e) Carril 5: Amplicón de 354 pb obtenido a 1 ng de concentración de ADN viral
- f) Carril 6: Amplicón de 354 pb obtenido a 0.1 ng de concentración de ADN viral
- g) Carril 7: Amplicón de 354 pb obtenido a 0.01 ng de concentración de ADN viral
- h) Carril 8: Amplicón de 354 pb obtenido a 0.001 ng de concentración de ADN viral

El protocolo de sensibilidad fue establecido con este medio debido a que los procesos de obtención de la muestra tanto en lavado preputial como de tejido epitelial, después del proceso de ruptura celular, las muestras son preservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en presencia de este medio. Utilizando una relación entre la concentración de bases nitrogenadas presentes en los ácidos nucleicos se realizó una comparación entre el ADN obtenido en la sensibilidad de ésta matriz y el número de partículas virales detectadas por el método de amplificación estandarizado. Se obtuvo una cantidad aproximada de $1,3 \times 10^3$ partículas virales/ μL con lo cual podemos corroborar que los métodos moleculares, en especial PCR, pueden

detectar un número reducido de partículas virales presentes en una muestra y que a su vez, la integridad del ADN no se ve afectada de manera significativa en la matriz seleccionada, en comparación con los trabajos realizados por (Navarrete et al, 2004; Ojeda et al 2016) en los cuales la sensibilidad es detectada por título viral. Los límites de detección obtenidos en cada una de las investigaciones son demasiado bajos en comparación con protocolos de amplificación genética reportados por (Rodríguez et al, 2007; Rodas, et al 2016).

5.9.2 Inoculación de ADN viral en células de tejido epitelial

En la Figura 25 se pueden observar los productos de la reacción de las diluciones seriadas y el nivel de degradación del ADN presente en este ensayo, con lo cual se evidencia una banda íntegra. Sin embargo, debido a que al utilizar medio de cultivo celular (DMEM) inoculado con células de tejido epitelial, éstas contienen un nivel alto de contaminantes que podrían afectar al ADN viral inoculado en la muestra y de manera principal a la Taq polimerasa (Melo et al, 2005; Myriam et al, 20012). Se determinó que la reacción estandarizada detectó una cantidad aproximada de 1 ng de ADN viral en presencia de células provenientes de tejido epitelial.

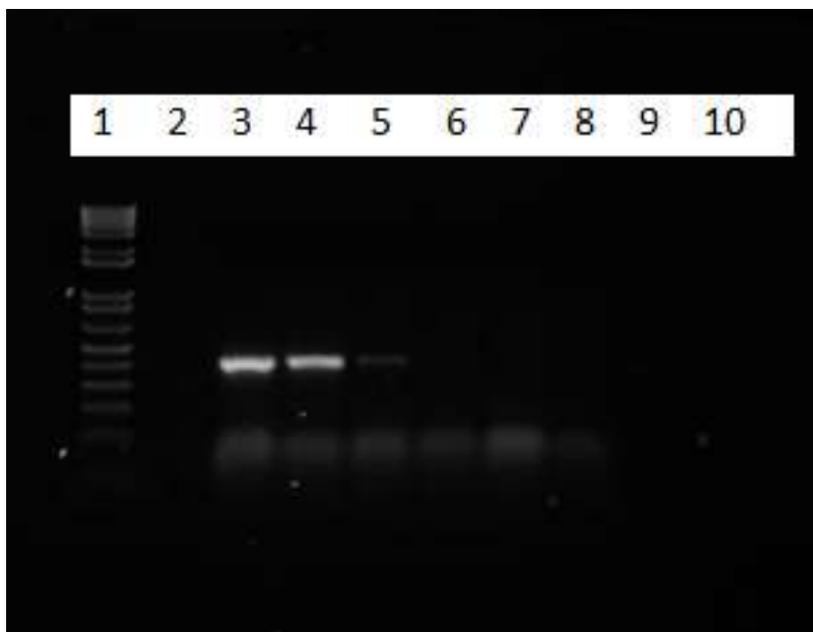


Figura 25. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% del producto de PCR específico para el fragmento de 354 pb promotor del gen gC.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb
- b) Carril 2: Control negativo con agua DEPC
- c) Carril 3: Control Positivo
- d) Carril 4: Amplicón de 354 pb obtenido a 10 ng de concentración de ADN viral en presencia de tejido epitelial
- e) Carril 5: Amplicón de 354 pb obtenido a 1 ng de concentración de ADN viral en presencia de tejido epitelial
- f) Carril 6: Amplicón de 354 pb obtenido a 0.1 ng de concentración de ADN viral en presencia de tejido epitelial
- g) Carril 7: Amplicón de 354 pb obtenido a 0.01 ng de concentración de ADN viral en presencia de tejido epitelial
- h)** Carril 8: Amplicón de 354 pb obtenido a 0.001 ng de concentración de ADN viral en presencia de tejido epitelial

El protocolo de sensibilidad fue establecido con esta matriz debido a que los procesos de obtención de las muestras realizadas en los Laboratorios de Agrocalidad, inciden en análisis diferenciales para la exclusión de Fiebre Aftosa, además de que IBR es una enfermedad de detección obligatoria establecida por la

OIE 2017. Es importante resaltar que la cantidad de inhibidores y contaminantes como la hematina presente en la sangre o restos sanguíneos, la melanina presente en el tejido epitelial o sustancias húmicas que se utilizan como fertilizantes para el crecimiento del alimento de bovinos, podrían actuar directamente sobre el correcto funcionamiento de la Taq polimerasa debido a que la muestra contendría un porcentaje representativo de estos inhibidores, lo que podría influir en la degradación e inhibición del proceso de PCR (Zeddám et al, 2005).

Utilizando una relación entre la concentración de bases nitrogenadas presentes en los ácidos nucleicos se realizó una comparación entre el ADN obtenido en la sensibilidad de ésta matriz y el número de partículas virales detectadas por el método de amplificación estandarizado. Se obtuvo una cantidad aproximada de $1,3 \times 10^4$ partículas virales/ μL con lo cual podemos corroborar que los métodos moleculares, en especial la PCR, pueden detectar un número reducido de partículas virales presentes en una muestra y aunque la integridad del ADN se vio afectada de manera significativa a comparación con el anterior ensayo, sigue detectando un número representativo de partículas virales. A comparación con los trabajos realizados por (Martínez et al, 2008; Rocha et al, 1995) en los cuales la sensibilidad es detectada por título viral (método tradicional empleado para la detección de BoHV-1), los límites de detección obtenidas en cada una de las investigaciones son demasiado alto a comparación de protocolos de amplificación genética reportados por (Obando et al 2010; Avila et al, 2008).

5.9.3 Inoculación de ADN viral en Semen

En la Figura 26 se pueden observar los productos de la reacción de las diluciones seriadas y el nivel de degradación del ADN presente en este ensayo. Se determinó que la reacción estandarizada detectó una cantidad aproximada de 10 ng de ADN vira en presencia de células reproductivas (semen).

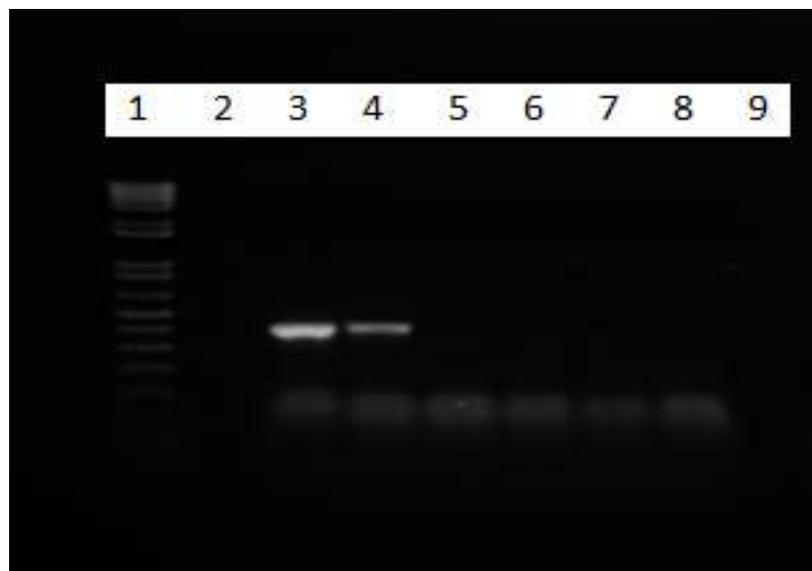


Figura 26. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% del producto de PCR específico para el fragmento de 354 pb promotor del gen gC.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb
- b) Carril 2: Control negativo con agua DEPC
- c) Carril 3: Control Positivo
- d) Carril 4: Amplicón de 354 pb obtenido a 10 ng de concentración de ADN viral en semen
- e) Carril 5: Amplicón de 354 pb obtenido a 1 ng de concentración de ADN viral en semen
- f) Carril 6: Amplicón de 354 pb obtenido a 0.1 ng de concentración de ADN viral en semen
- g) Carril 7: Amplicón de 354 pb obtenido a 0.01 ng de concentración de ADN viral en semen
- h) Carril 8: Amplicón de 354 pb obtenido a 0.001 ng de concentración de ADN viral en semen

Es importante resaltar que, en este tipo de muestras, existe gran cantidad de inhibidores y contaminantes como ácido ascórbico, zinc, colesterol, proteínas, calcio, cloro, antígenos de grupos sanguíneos, ácido cítrico, magnesio, vitamina b12, fósforo, sodio, potasio, ácido úrico, ácido láctico nitrógeno, vitamina c entre otros, que podrían actuar sobre el ADN viral y en el correcto funcionamiento de la Taq polimerasa lo que puede influir en la inhibición del proceso de PCR (Zedd

et al, 2005). El protocolo de sensibilidad fue establecido con estas muestras debido a que los procesos estándar de detección de patógenos los señalan como obligatorios al realizar Inseminación Artificial (IA) aparte de que se quiere estandarizar protocolos de control rigurosos del material reproductivo que ingresa al país proveniente del extranjero. Utilizando una relación entre la concentración de bases nitrogenadas presentes en los ácidos nucleicos se realizó una comparación entre el ADN obtenido en la sensibilidad de ésta matriz y el número de partículas virales detectadas por el método de amplificación estandarizado. Se obtuvo una cantidad aproximada de $1,3 \times 10^5$ partículas virales/ μL con lo cual podemos corroborar que los métodos moleculares, en especial la PCR, pueden detectar un número reducido de partículas virales presentes en una muestra y aunque la integridad del ADN se vio afectada de manera significativa a comparación con el anterior ensayo, sigue detectando un número representativo de partículas virales. A comparación con los trabajos realizados por (Martínez et al, 2008; Rocha et al, 1995) en los cuales la sensibilidad es detectada por título viral (método tradicional empleado para la detección de BoHV-1), los límites de detección obtenidas en cada una de las investigaciones son demasiado bajas a comparación de protocolos de amplificación genética reportados por (Piedrahita et al 2005; Rodas et al, 2016).

5.9.4 Inoculación de sobrenadante viral en medio de cultivo celular DMEM

En la Figura 27 se puede observar los productos de amplificación para la determinación del límite de detección de la PCR utilizando el sobrenadante viral para la infección, se realizó el proceso de extracción de ADN y se amplificó cada una de las muestras por PCR. Se determinó que la reacción estandarizada detectó hasta una dosis infectiva (TCID_{50}) ($10^{6.23}$) de sobrenadante viral en medio de cultivo celular DMEM.

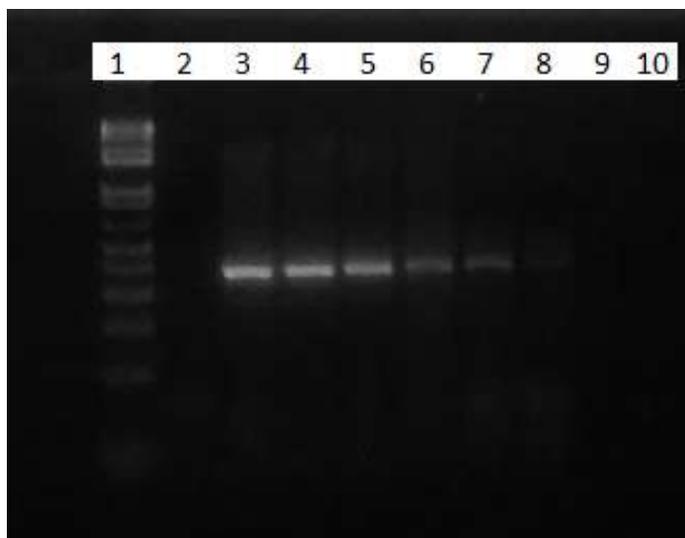


Figura 27. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% del producto de PCR específico para el fragmento de 354 pb promotor del gen gC.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb
- b) Carril 2: Control negativo con agua DEPC
- c) Carril 3: Control Positivo
- d) Carril 4: Amplicón de 354 pb obtenido a una dilución de sobrenadante viral de 1×10^{-4}
- e) Carril 5: Amplicón de 354 pb obtenido a una dilución de sobrenadante viral de 1×10^{-5}
- f) Carril 6: Amplicón de 354 pb obtenido a una dilución de sobrenadante viral de 1×10^{-6}
- g) Carril 7: Amplicón de 354 pb obtenido a una dilución de sobrenadante viral de $1 \times 10^{-6,23}$ (DI_{50})
- h) Carril 8: Amplicón de 354 pb obtenido a una dilución de sobrenadante viral de 1×10^{-7}

Este resultado es coherente, teniendo en cuenta que, al mantener protegido el material genético por la cápside, se produce una menor degradación del material genético en comparación con los resultados obtenidos en los apartados anteriores. Además, con este experimento se corroboran los resultados obtenidos en la titulación viral ya que en ésta se pudo observar un efecto citopático cuando se empleó el cálculo de una dosis infectiva del virus. En el método de titulación viral es imperativo determinar hasta qué punto es visible el efecto citopático y realizar el cálculo de la dosis infectiva de Reed y Muech para establecer el límite de detección en cultivo celular. Sin embargo, es importante mencionar que el grado

de adaptación del virus a las células y el número de pases realizados para la replicación viral es directamente proporcional al número de partículas obtenidas por el cálculo; como ejemplo tenemos el caso de la investigación realizada por (Vera et al, 2008) en la cual se aisló BoHV-1 de muestras de semen que al tercer pase viral en células MDBK se obtuvo un título viral de $10^{5.15}$ mientras que utilizando una cepa control el título fue de $10^{5.63}$ a comparación del protocolo utilizado en ésta investigación en la cual solo se realizaron únicamente dos pases en cultivo primario de células de testículo de ternero. Resultados similares se pueden observar en los trabajos de (Piedrahita et al, 2005; Herrera, 1979; Golán, 1999; Correa et al, 1975).

5.9.5 Inoculación del sobrenadante viral en células de tejido epitelial

En la Figura 28 se pueden observar los productos de amplificación para la determinación del límite de detección de la PCR, se puede observar que la acción de los inhibidores afectó la sensibilidad de la reacción, sin embargo, este resultado era esperado pues las condiciones empleadas se acercan a las reales. Las muestras clínicas obtenidas en campo suelen contener concentraciones de contaminantes mayores o semejantes a las empleadas en este ensayo.

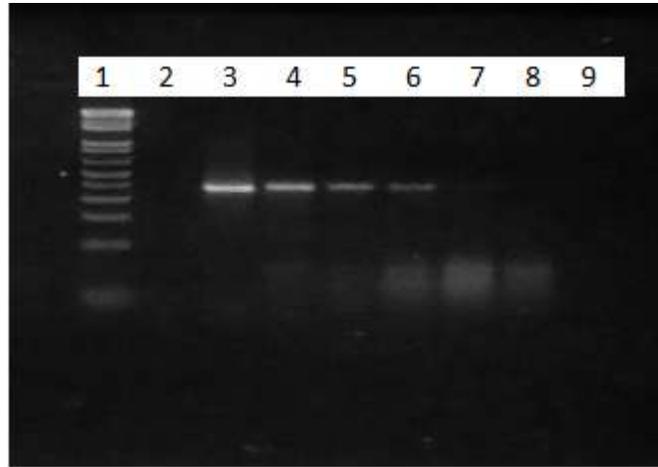


Figura 28. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% del producto de PCR específico para el fragmento de 354 pb promotor del gen gC.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb
- b) Carril 2: Control negativo con agua DEPC
- c) Carril 3: Control Positivo
- d) Carril 4: Amplicón de 354 pb obtenido a una dilución de sobrenadante viral de 1×10^{-4} en presencia de tejido epitelial
- e) Carril 5: Amplicón de 354 pb obtenido a una dilución de sobrenadante viral de 1×10^{-5} en presencia de tejido epitelial
- f) Carril 6: Amplicón de 354 pb obtenido a una dilución de sobrenadante viral de 1×10^{-6} en presencia de tejido epitelial
- g) Carril 7: Amplicón de 354 pb obtenido a una dilución de sobrenadante viral de $1 \times 10^{-6,23}$ (DI_{50}) en presencia de tejido epitelial
- h) Carril 8: Amplicón de 354 pb obtenido a una dilución de sobrenadante viral de 1×10^{-7} en presencia de tejido epitelial

La inoculación del sobrenadante viral se realizó con éxito siguiendo el protocolo de infección descrito en el apartado 4.9.2.2. Tras la infección se realizaron diluciones seriadas tal y como se detalló en el ya mencionado apartado y después se realizó el proceso de extracción de ADN y se amplificó cada una de las muestras por PCR. Se determinó que la reacción estandarizada detectó hasta una dilución 1×10^{-6} de sobrenadante viral en presencia de células provenientes de tejido epitelial. Es obvio que, al mantener protegido el material genético por la cápside, se produce

una menor degradación en comparación con los resultados obtenidos en los apartados anteriores en los cuales se utilizaba el ADN viral directamente. Sin embargo, los inhibidores de la PCR interfieren en el proceso de amplificación del DNA, actuando a diferentes niveles, ya sea mediante la degradación o enlace de ácidos nucleicos o a la interacción con iones Mg^{2+} , impidiendo por tanto su unión con cualquier DNA polimerasa (Peist et al., 2001). Se han descrito una gran cantidad de componentes de origen natural, introducidas durante el mismo proceso de la PCR, como inhibidores. De acuerdo a lo anterior, Moreira (1998) señala que diversas secreciones, alimentos, materia orgánica e incluso muestras con altas concentraciones bacterianas, pueden ocasionar una ineficiente amplificación del DNA.

5.9.6 Inoculación del sobrenadante viral en semen

En la Figura 29 se pueden observar los productos de amplificación para la determinación del límite de detección de la PCR, se puede observar que la acción de los inhibidores afectó la sensibilidad de la reacción, sin embargo, este resultado era esperado pues las condiciones empleadas se acercan a las reales.

Se determinó que la reacción estandarizada detectó hasta una dilución 1×10^{-4} de sobrenadante viral en presencia de células reproductivas (semen). Es obvio que, al mantener protegido el material genético por la cápside, se produce una menor degradación en comparación con los resultados obtenidos en los apartados anteriores en los cuales se utilizaba el ADN viral directamente.

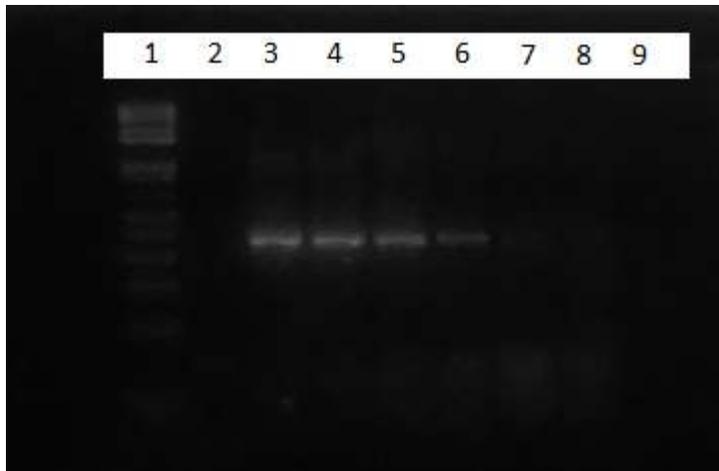


Figura 29. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% del producto de PCR específico para el fragmento de 354 pb promotor del gen gC.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb
- b) Carril 2: Control negativo con agua DEPC
- c) Carril 3: Control Positivo
- d) Carril 4: Amplicón de 354 pb obtenido a una dilución de sobrenadante viral de 1×10^{-2} en presencia de semen
- e) Carril 5: Amplicón de 354 pb obtenido a una dilución de sobrenadante viral de 1×10^{-3} en presencia de semen
- f) Carril 6: Amplicón de 354 pb obtenido a una dilución de sobrenadante viral de 1×10^{-4} en presencia de semen
- g) Carril 7: Amplicón de 354 pb obtenido a una dilución de sobrenadante viral de 1×10^{-5} en presencia de semen
- h) Carril 8: Amplicón de 354 pb obtenido a una dilución de sobrenadante viral de 1×10^{-6} en presencia de semen

Las muestras clínicas obtenidas en campo suelen contener concentraciones de contaminantes mayores o semejantes a las empleadas en este ensayo. Se han descrito una gran cantidad de componentes de origen natural, introducidas durante el mismo proceso de la PCR, como inhibidores. De acuerdo a lo anterior, Moreira (1998) señala que diversas secreciones, alimentos, materia orgánica e incluso muestras con altas concentraciones bacterianas, pueden ocasionar una

ineficiente amplificación del DNA. Este es el caso del semen, la inhibición de la reacción de PCR probablemente se dio debido a las altas concentraciones de iones de Na, K, Cl y azúcares como la fructosa y la glicerofosforilcolina que se encuentran disueltas en el plasma seminal aparte de un gran número de compuestos que podrían haber interferido en el ensayo como ácido ascórbico, zinc, colesterol, proteínas, calcio, cloro, antígenos de grupos sanguíneos, ácido cítrico, magnesio, vitamina b12, fósforo, sodio, potasio, ácido úrico, ácido láctico, nitrógeno, vitamina c entre otros.

5.10 Especificidad

En la Figura 30 se puede observar la especificidad de los cebadores utilizados para detectar BoHV-1. No se observa amplificación al emplear tres diferentes tipos de ADN; uno de ellos heterólogo (BoHV-2) y los dos restantes provenientes de bacterias que podrían estar presentes en muestras de lavados prepuciales y semen. Se puede apreciar que solo existió amplificación del control positivo de BoHV-1 lo cual indica que los cebadores utilizados en este trabajo de investigación son específicos para la identificación del virus en cuestión y amplifican únicamente la región gC que es de interés para el diagnóstico diferencial de la enfermedad en ganado reproductor.

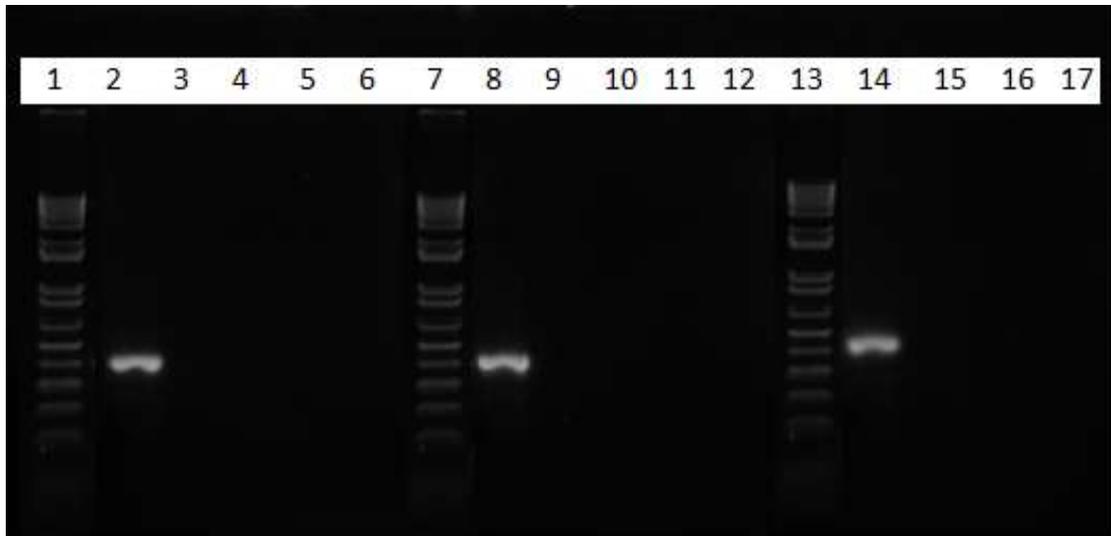


Figura 30. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% del producto de PCR específico para el fragmento de 354 pb promotor del gen gC.

- a) Carril 1, 7 y 13: Marcador de peso molecular de 1 Kb
- b) Carril 2, 8 y 14: Controles positivos
- c) Carril 3-5: Ensayos de PCR usando ADN de BoHV-2
- d) Carril 9-11: Ensayos de PCR usando ADN de *Campylobacter*
- e) Carril 15-17: Ensayo de PCR usando ADN de *Leptospira*
- f) Carril 6 y 12: Control negativo usando agua DEPC

Según (Bracho et al, 2006; Rodríguez et al 2007) la especificidad puede ser realizada partiendo de una determinación cuantitativa de patógenos presentes en una muestra, es así que debido a la posible presencia de *Campylobacter fetus fetus* y *Leptospira spp* en muestras recolectadas como es el caso de (Wang et al, 2002; Schulze et al, 2006; Smythe et al, 2002) se puede validar la especificidad de los cebadores utilizados en este proyecto de investigación. Sin embargo, a parte de estas dos bacterias patógenas se incluyó en la corrida el ADN viral de BoHV-2 como análisis comparativo de una secuencia específica que no se encuentra presente en este patógeno viral.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

Los cuatro métodos de extracción de ADN viral utilizados en esta investigación son satisfactorios para el proceso de amplificación génica, sin embargo en el que se obtuvo mayor pureza fue con el Paquete de Extracción Kit High Pure Viral Nucleic Acid (Roche, Alemania), debido que posee varios pasos en los cuales se incluyen inhibidores de contaminantes y reactivos que dan prioridad a la obtención del ADN viral.

La optimización de las condiciones de amplificación génica se ajustaron a lo descrito previamente en la bibliografía, enfocándonos en los procesos de hibridación, concentración de $MgCl_2$ y concentración de cebadores debido a que estos parámetros intervienen en el correcto funcionamiento de la Taq polimerasa y por ende en la amplificación del gen específico (gC).

La sensibilidad del protocolo estandarizado es satisfactoria, se pudo determinar que no solo detecta el virus activo y latente sino también restos virales ya que la técnica de PCR posee parámetros de detección más amplios y específicos que otros métodos tradicionales utilizados en la actualidad.

La especificidad analizada en el presente ensayo demostró la validez de los cebadores para amplificar únicamente el gen específico de la glicoproteína C (gC) debido a que es una secuencia conservada que incide en la virulencia y prevalencia de la enfermedad en el hospedador, además que se realizó análisis comparativos con BoHV-2, *Campylobacter fetus fetus* y *Leptospira spp* que podrían estar presentes al momento de la recolección de la muestra.

6.2 Recomendaciones

Realizar muestreos a nivel nacional con el fin de determinar si existe prevalencia del virus en el país.

Validar el protocolo descrito en muestras de campo con el fin de determinar la variación en el límite de detección para el protocolo estandarizado.

Promover la utilización de métodos de diagnóstico moleculares para la detección de patógenos de interés en muestras animales.

Determinar la incidencia de inhibidores de la Taq polimerasa presentes en cada una de las muestras a ser analizadas.

REFERENCIAS

- Ackermann, M., Müller, H. K., Bruckner, L., & Kihm, U. (1990). *Eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Switzerland: review and prospects*. *Veterinary microbiology*, 23(1-4), 365-370.
- Alvarado, I. A., Aguilar, S. A., Mejía, S. P., De Paz, V. O., & Vilchis, M. C. (1993). Aislamiento y tipificación de una cepa de herpes virus bovino 1, del tipo vulvovaginitis pustular infecciosa. *Téc Pecu Méx*, 31, 72-83.
- Arboleda, J. J., Rodas, J. D., Ossa, J. E., & Zuluaga, F. N. (2016). Espectro clínico y epidemiológico de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina: Generalidades. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 9(1), 3-13.
- Aycardy, E., Sanclemente, V., & Cortés, J. (1978). Prevalencia de anticuerpos para el virus de la rinotraqueitis bovina infecciosa en ganado de carne en Colombia y aislamiento del virus de los casos clínicos. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 30, 14-19.
- Avila Sánchez, M., Rodríguez Medina, M., Díaz de Arce, H., & Barrera Valle, M. (2008). Diagnóstico virológico de Herpesvirus Bovino tipo-1. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 9(3).
- Babiuk L., S. van Drunen Littel-van den Hurk, and S. Tikoo. 1996. *Immunology of bovine herpesvirus 1 infection*. *Vet Microbiol*. 53: 31-42.
- Barrera, M. (1996). Herpesvirus Bovino-1: Obtención de Medios de Diagnóstico y Prevención (Doctoral dissertation, Tesis para la Opción del Grado Científico de Dr. C. Veterinaria. ISCAH. CENSA. Cuba).
- Betancur C., M. Gonzales, L. Reza. 2006. Seroepidemiología de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina. *Córdova-Colombia Vol. 11. No. 2*.
- Busch MG, Bateman AC, Landolt GA, Karasin AI, Brockman-Schneider RA, Gern JE, et al. (2008). *Identification of amino acids in the HA of H3 influenza viruses that determine infectivity levels in primary swine respiratory epithelial cells*. *Virus Research*, Volume 133, Issue 2, Pages 269-279.
- Blickenstorfer, S., Engels, M., Guerdat, C., Saucy, C., Reist, M., Schwermer, H., Perler, L. (2010). *Infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in the canton of*

- Jura: an epidemiological outbreak investigation.* Schweiz. Arch. Tierheilkd. 152(12): 555-560.
- Blood, D. C. R., de DC Blood, O. M., & Radostits, O. M. (1992). *Medicina veterinaria: libro de texto de las enfermedades del ganado vacuno, ovino, porcino, caprino y equino* (No. V600 BLOvE 7a. ed).
- Bracho, C.A., Jaramillo, A.C.J., Martínez, M.J.J., Montaña, H.A., Olguín, YB.A. (2006). Comparación de tres pruebas diagnósticas para el aborto por rinotraqueitis infecciosa bovina en hatos lecheros. *Vet. Mex.*, 37 (2): 0301-5092.
- Bratanich, A.C., Sardi, S.I., Smitsaart, E.N., Schudel, A.A. (1991). *Comparative studies of BoHV-1 variants by in vivo and in vitro test.* *Zentralblatt für Veterärmedizin Reihe B.* 38(1): 41-48.
- Breese and Dardiri. 1972. *Electron Microscopic Characterization of a Bovine Herpes Virus from Minnesota.* *J. gen. Virol.* 15, 69-72.
- Brenner J. Sharir JA, Yadin H., Perl S., Stram Y., 2009. *Herpesvirus 2 in biopsy of a cow with possible pseudo lumpy skin disease.* *Vet. Rec.*, 165: 539-540.
- Carbonero, A., Saa, L.R., Jara,D.V., García-Bocanegra, I., Borge, C., Perea, A. (2011). *Seroprevalence and risk factors associated to Bovine Herpesvirus 1 (BoHV-1) infections in non-vaccinated dairy and dual-purpose cattle herds in Ecuador.* *Preventive of Veterinary Medicine.* 100(1):84-88.
- Cardona-Maya, W., Berdugo, J., & Cadavid, A. (2008). Comparación de la concentración espermática usando la cámara de Makler y la cámara de Neubauer. *Actas urológicas españolas*, 32(4), 443-445.
- Cardozo, E., Bancharo, L. A., Guarino, H., Diana, V., & Lozano, A. (2008). Análisis de la asociación de Queratoconjuntivitis Bovina Infecciosa con Herpes Virus Bovino-1, en terneros de tres meses a un año de edad en el Uruguay. *Veterinaria,(Montevideo)*, 44(172), 17-21.

- Cândido, A. L., Bontempo, E. D., & Resende, M. (2000). *Polymerase chain reaction amplification of genomic fragments of bovine herpesvirus-1*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 95(2), 225-226.
- Coolen, M. J. (2011). *7000 years of Emiliania huxleyi viruses in the Black Sea*. Science, 333(6041), 451-452.
- CONNOLLY SA, WHITBECK JJ, RUX AH, KRUMMENACHER C, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, COHEN GH, et al. (2001). *Glycoprotein D Homologues in Herpes Simplex Virus Type 1, Pseudorabies Virus and Bovine Herpesvirus-1 Bind Directly to Human HveC (nectin-1) with Different Affinities*. Virology;280:7-18.
- Conlon, P., Ogunbiyi, P., Perron, R., & Eyre, P. (1987). *Effects of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus Infection on Bovine Airway reactivity*. Canadian Journal of Veterinary Research. No 51. p. 345-349.
- Chaparro, J. J., Ramírez, G. C., Vera, V. J., & Villamil, L. C. (2003). Evaluación de la actividad patogénica de una cepa de campo del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina en terneros. Congreso Internacional. Viña del Mar, Chile: ISVEE.
- Chase C., L. Braun, J. Jessen, and D. Hurley. 1995. *Studying virus cell interactions: finding new ways to prevent infectious bovine rhinotracheitis in cattle*. Departments of Veterinary Science and Biology/Microbiology.
- Claassen, S., du Toit, E., Kaba, M., Moodley, C., Zar, H. J., & Nicol, M. P. (2013). *A comparison of the efficiency of five different commercial DNA extraction kits for extraction of DNA from faecal samples*. Journal of microbiological methods, 94(2), 103-110.
- Claus, M. P., Alfieri, A. F., Folgueras-Flatschart, A. V., Wosiacki, S. R., Médici, K. C., & Alfieri, A. A. (2005). *Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR*. Journal of virological methods, 128(1), 183-188.

- Condori D. 2014. Seroprevalencia de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) en la Microcuenca Llallimayo, Provincia de Melgar. Tesis. Universidad Nacional del Altiplano Puno.
- Dasika, G. K., & Letchworth, G. J. (1999). *Cellular expression of bovine herpesvirus 1 gD inhibits cell-to-cell spread of two closely related viruses without blocking their primary infection*. *Virology*, 254(1), 24-36.
- Dasika, G. K., & Letchworth, G. J. (2000). *Homologous and heterologous interference requires bovine herpesvirus-1 glycoprotein D at the cell surface during virus entry*. *Journal of General Virology*, 81(4), 1041-1049.
- Deka, D., Ramneek, Maiti N.K., Oberoi, M.S. (2005). *Detection of bovine herpesvirus-1 infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction*. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 24 (3): 1085-1094.
- Díaz, J. C., Castell, S., & Barrera, M. (2006). *Diagnosis of Aujeszky's disease virus infection in samples of doubtful etiology*. *Rev. Salud. Anim*, 28(1), 36-39.
- Domínguez, D.D. (2009). Prevalencia y Factores de Riesgo asociados al Virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBRV), Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV), *Leptospira* spp, y *Neospora caninum*, en hatos con sistema vaca-cría del Estado de Nuevo León. Tesis Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Dora Kalman and Laszlo Egyed. 2005. *PCR Detection of Bovine Herpesinses from Non bovine Ruminants in Hungary*. *Journal of Wildlife Diseases*, 41(3). Pp.482-488.
- Ellis, J., Waldner, C., Rhodes, C., Ricketts, V. (2005). *Longevity of protective immunity to experimental bovine herpesvirus-1 infection following inoculation with a combination modified-live virus vaccine in beef calves*. *J. Am. Vet. Assoc.* 227(1):123- 128.

- Fenner, F.J., Gibbs, E.P.J., Murphy, F.A., Rott, R., Studdert, M.J. and White, D.O.. (1993). *Herpesviridae*. In: *Veterinary Virology*, Academic Press Ltd., London, pp. 337-368.
- Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., Sommer, M. O., & Dantas, G. (2012). *The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens*. *science*, 337(6098), 1107-1111.
- GALVÃO, C. D., Doria, J. D., & Alice, F. J. (2006). *Anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em bovinos do Brasil*. *Boletim do Instituto biológico da Bahia*, 6(1), 15-25.
- GERAGHTY RJ, KRUMMENACHER C, COHEN GH, EISENBERG RJ, SPEAR, P.G. (1998). *Entry of alphaherpesvirus mediated by poliovirus receptor-related protein-1 and poliovirus receptor*. *Science*;280:1618-1620.
- Gibbs, E. P. J., & Rweyemamu, M. M. (1977). *Bovine herpesviruses. I. Bovine herpesvirus 1*. *The Veterinary Bulletin*. Vol. 47, No. 5; p. 317-340.
- Gomez N. 2003. *Epidemiología Veterinaria*. 2da Edición. CIP – Chuquibambilla. Universidad Nacional del altiplano Puno.
- Góngora, A., Villamil, L. C., Vera, V. J., Parra, J. L., Ramírez, G., & López, G. (1995). *Aislamiento de un herpes virus bovino tipo-1 (HVB-1) de secreción nasal y esmegma prepucial en un toro reproductor*. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 43(1), 43-60.
- Hanon, E., Keil, G., Griebel, P., Vanderplasschen, A., Rijsewijk, F. A., Babiuk, L., & Pastoret, P. P. (1999). *Bovine herpesvirus 1-induced apoptotic cell death: role of glycoprotein D*. *Virology*, 257(1), 191-197.
- Humann, J. L., Ziemkiewicz, H. T., Yurgel, S. N., & Kahn, M. L. (2009). *Regulatory and DNA repair genes contribute to the desiccation resistance of *Sinorhizobium meliloti* Rm1021*. *Applied and environmental microbiology*, 75(2), 446-453.
- HUNTER E. (2001). *Virus Assembly*. Chapter 8. In: Knipe, DM., Howley, PM., Fields' *Virology* edition 4th, Vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. p. 171-197.

- Hurtado, C. B., Tous, M. G., & García, L. R. (2006). Seroepidemiología de la rinotraqueitis infecciosa bovina en el Municipio de Montería, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 11(2), 830-836.
- Jones, C. (2003). *Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency*. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1), 79-95.
- Kahrs, R.F. (2001). *Infectious Bovine Rhinotracheitis and Infectious Pustular Vulvovaginitis*. *Viral Diseases of Cattle*. 2ª.Ed. Iowa State University Press: Ames Iowa, USA. 18: 159-170.
- Kelly, W. R., Jubb, K. V. F., Kennedy, P. C., & Palmer, N. (1993). *Pathology of domestic animals*. *Pathology of domestic animals*, Vol. 2.
- Kennedy N, Walker A, Berry S, Duncan S, Farquarson F, Louis P, et al. (2014). *The impact of different DNA extraction kits and laboratories upon the assessment of human gut microbiota composition by 16S rRNA gene sequencing*. *PLoS ONE*;9:e88982
- Lata, J. (2006). *Detection of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) infection in breeding bulls by serological and molecular methods and its characterization by sequencing of PCR products*. Thesis of Master of Veterinary Science. Anand Agricultural University. Department of Veterinary Microbiology.
- LESKO J., VEBER P., HRDA M., FEKETEÓVA. (1993). *Large scale production of infectious bovine rhinotracheitis virus in cell culture on microcarriers*. *Acta Virol*. 37, 73-78.
- Li, Y., Babiuk, L. A., & Liang, X. (1995). *Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C, and D: identification of a dual cell-binding function of gB*. *Journal of virology*, 69(8), 4758-4768.
- Lovato, L., Inman, M., Henderson, G., Doster, A., Jones, C. (2003). *Infection of cattle with a bovine herpesvirus 1 strain that contains a mutation in the latency-related gene Leads to increased apoptosis in trigeminal ganglia during the transition from acute infection to latency*. *Journal of Virology*. 77(8):4848-4857.
- Martin S., A. Mekk, P. Willeberg y P. Tarazona. 1997. *Epidemiologia Veterinaria. Principios y Métodos*. Zaragoza-España. Editorial Acribia.

- Martínez Carlier, P. J., Santos, R., & Maelisa, I. (2008). Antecedentes, generalidades y actualización en aspectos de patogénesis, diagnóstico y control de la diarrea viral bovina (DVB) y rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) (Bachelor's thesis).
- Manual del Usuario Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting, Celeromix, España. Recuperado el 5 de mayo de 2017 de <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>
- Melo, A., Roa, I., Montenegro, S., Capurro, I., & Roa, J. C. (2005). Estudio comparativo de detección del virus papiloma humano (VPH) en muestras citológicas y biopsias de cuello uterino. *Revista médica de Chile*, 133(6), 639-644.
- MEURENS F, SCHYNTS F, KEIL GM, MUYLKENS B, VANDERPLASSCHEN, A, GALLEGOS P. (2004). *Superinfection prevents recombination of the alphaherpesvirus bovine herpesvirus-1*. *J Virol*.78:3872-3879.
- Miller J., C. Whetstone, and M. Van der Maaten. 1991. *Abortifacient potential of bovine herpesvirus tipo 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA*. *Am J Vet Res*. 52: 458-461.
- Moore, S., Gunn, M., & Walls, D. (2000). *A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions*. *Veterinary microbiology*, 75(2), 145-153.
- Molano, D., & Rodríguez, J. (1995). Caracterización electroforética e inmunológica de una cepa de campo del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB) y su comparación con cepas de referencia. Tesis de grado. Santa fe de Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia.
- Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzinek, M. C., & Studdert, M. J. (1999). *Veterinary virology*. Academic press.
- Navarrete, J., Vera, V. J., Ramírez, G., & Jiménez, L. C. V. (2002). Anticuerpos monoclonales contra proteínas de la nucleocápside del virus IBR y su

- evaluación por ELISA. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 4(1), 114-120.
- Myriam, L. M., Marcelo, M., & Luis, A. M. (2012). Valoración diagnóstica de técnicas moleculares para detección de infección bucal por virus del papiloma humano. *Enf Inf Microbiol*, 32(1), 25-30.
- Obando A. y M. Rodríguez. 2005. Manual de Ganadería Doble Propósito Rinotraqueitis Infecciosa Bovina y Diarrea Viral Bovina. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. INIA-Maracay-Venezuela.
- Obando, C., Hidalgo, M., Montoya, Y., Boyer, L., Bracamonte, M., Conde, F., & Garzaro, D. (2010). Identificación molecular de una cepa de herpesvirus bovino tipo 2 en Venezuela. *Revista Científica*, 20(1).
- OIE. 2000-2014. Office International of Epizooties. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Infectious Bovine Rhinotracheitis / Infectious Vulvovaginitis. Ch. 2.3.5. O.I.E. Paris. Recuperado el 10 de mayo de 2017 de http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.04.13.%20Rinotraqueitis%20infecciosa%20bovina.pdf
- Papich M., M. Heit, y J. Rivieri 2003. Fármacos Antifúngicos y Antivíricos. Farmacología y terapéutica veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza – España. p. 996-997
- Pariante E., A. Ccama, H. Rivera. 2006. Anticuerpos contra el virus causante de la rinotraqueitis infecciosa en vacunos de la provincia de Melgar, Puno. Tesis de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNA Puno.
- Pastoret, P. P., Burtonboy, G., Aguilar-Setien, A., Godart, M., Lamy, M. E., & Schoenaers, F. (1980). *Comparison between strains of infectious bovine rhinotracheitis virus (Bovine herpesvirus 1), from respiratory and genital origins, using polyacrylamide gel electrophoresis of structural proteins*. *Veterinary Microbiology*, 5(3), 187-194.
- Pidone C., M. Galosi, y M. Etcheverrigaray. 1999. Herpesvirus Bovinos 1 y *Analecta Veterinaria* (Argentina). 19: 40-50.

- Piedrahita, D., Ramírez, G., & Vera, V. (2005). Detección y caracterización por métodos moleculares de aislamientos colombianos de Herpesvirus bovino tipo 1. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 52(II), 120-127.
- Pritchard G., Cook N. & Banks M. 1997. *Infectious pustular vulvovaginitis/infectious pustular balanoposthitis in cattle*. *Vet. Rec.* 140(22):587.
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). *A simple method of estimating fifty per cent endpoints*. *American journal of epidemiology*, 27(3), 493-497.
- Richey E. 1994. *IBR in beef cattle (Infectious bovine rhinotracheitis/rednose)*. VM-55. University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences.
- Ríos Z., y E. Alberto. 2000. Seroprevalencia del virus de rinotraqueitis infecciosa bovina en Bovinos Criollos de crianza extensiva de la Provincia de Parinacocha- Perú.
- Rijsewijk, F. A., Kaashoek, M. J., Langeveld, J. P., Meloen, R., Judek, J., Bie, K., & Van Oirschot, J. T. (1999). *Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains*. *Journal of General Virology*, 80(6), 1477-1483.
- ROIZMAN B, PELLETT PE. (2001). *The family herpesviridae: A brief introduction*. In *Fields Virology*, Fourth edition. Knipe DM and Howley PM, Editors. Lippincott Williams & Wilkins. USA. p. 2381-2397.
- Rock, D., Lokensgard, J., Lewis, T., & Kutish, G. (1992). *Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1*. *Journal of Virology*, 66(4), 2484-2490.
- Rodas, J. D., Zuluaga, F. N., Henao, G., Restrepo, M., & Ossa, J. E. (2016). Estandarización de una prueba de ELISA para detección de anticuerpos contra el herpesvirus bovino-1 en suero lácteo. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 9(1), 40-44.
- Rodríguez, M., Avila, M., Díaz de Arce, H., & Barrera, M. (2007). DISEÑO DE UN ENSAYO DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA DETECCIÓN DE Herpesvirus bovino tipo 1. *Revista de Salud Animal*, 29(1), 21-27.

- Rocha, M., Leite, R., & Gouveia, A. M. (1995). La técnica del cultivo celular en microplacads en el aislamiento del virus herpes bovino-1 en semen bovino. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 10(2).
- Rola, J., Larska, M., & Polak, M. P. (2005). *Detection of bovine herpesvirus 1 from an outbreak of infectious bovine rhinotracheitis*. *Bulletin-Veterinary Institute In Pulawy*, 49(3), 267.
- Ruiz, A., (1977). Complejo Rinotraqueitis Bovina Infecciosa Vulvovaginitis Pustular Infecciosa. *Enfermedades de los Bovinos. Enfermedades de los animales Domésticos en República Dominicana. Dirección General de Ganadería Sub Programa de Sanidad Animal. Santo Domingo. República Dominicana.*
- Ruiz, J., Jaime, J., Vera, V. (2008) Latencia del herpesvirus bovino-1: El papel de los transcritos relacionados con latencia (RL). *Acta biol. Colomb.*, Vol. 13 No.1: 3- 22.
- Sáenz, J. R., Jaime, J., & Vera, V. (2010). Prevalencia serológica y aislamiento del Herpesvirus Bovino-1 (BHV-1) en hatos ganaderos de Antioquia y del Valle del Cauca. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 23(3), 299-307.
- Sánchez T. 2003. Seroprevalencia del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina en Ganado lechero del valle de Lima. Tesis. UNMSM. Perú.
- Suresh K B, Sudarshan K J H, Rajasekhar M. (1999). *Seroprevalence of infectious bovine rhinotracheitis in India*. *Indian Veterinary Journal.*, 76: 5–9.
- Schang, L. M., Hossain, A., & Jones, C. (1996). *The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 encodes a product which inhibits cell cycle progression*. *Journal of virology*, 70(6), 3807-3814.
- Schulze, F., Bagon, A., Müller, W., & Hotzel, H. (2006). *Identification of Campylobacter fetus subspecies by phenotypic differentiation and PCR*. *Journal of clinical microbiology*, 44(6), 2019-2024.
- Schr, C., & Keil, G. M. (1999). *Bovine herpesvirus 1 requires glycoprotein H for infectivity and direct spreading and glycoproteins gH (W450) and gB for*

- glycoprotein D-independent cell-to-cell spread*. Journal of general virology, 80(1), 57-61.
- 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(23):12535-12542.
- SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. 1996. *Molecular virology of ruminant herpesviruses*. Vet. Microbiol. 53: 17-29.
- Smythe, L. D., Smith, I. L., Smith, G. A., Dohnt, M. F., Symonds, M. L., Barnett, L. J., & McKay, D. B. (2002). *A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic Leptospira spp*. BMC infectious diseases, 2(1), 13.
- TYLER KL, NATHANSON N. (2001). *Pathogenesis of Viral infections*. Chapter 7. In: Knipe, DM., Howley, PM., Fields` Virology edition 4th, Vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. p 199-243.
- Thiry, E., Saliky, J., Bublot, M., Pastoret, P.P. (1987). *Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport*. Comparative Immunology Microbiology Infectious Disease. 10:59-63.
- Thiry, J., Keuser, V., Muylkens, B., Meurens, F., Gogev, S., Vanderplasschen, A., Thiry, E. (2006) *Rumiant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1*. Vet. Res. 37: 169-190.
- Van Engelenburg, F.A.C, Van Schie, F.W., Rijsewijk, F.A.M, Van Oirschot, J.T. (1995). *Excretion of Bovine Herpesvirus 1 in semen is Detected Much Longer by PCR than by Virus Isolation*. Journal of Clinical Microbiology. 33 (2): 308-312.
- Van Oirschot, J., F. Rijsewijk, and M. Kaashoek. 1996. *Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines*. Vet Microbiol. 53:43-54.
- Van Oirschot, J. T. (1995). *Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review*. Veterinary Quarterly, 17(1), 29-33.
- Vera, A., Ramírez, V. J., Villamil, G. C., de Sandino, L. C. M., Martha Jaime, C., & Vera, J. V. J. (2006). *Biología molecular, epidemiología y control de la*

- rinotraqueitis bovina infecciosa y de la diarrea viral bovina (No. Doc. 23036) CO-BAC, Bogotá).
- Vera, A., & Betancur, H. (2008). Aislamiento del virus herpes bovino tipo 1 en bovinos del departamento de Córdoba-Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 13(3), 1495-1503.
- Vera V., C. Ramirez, L. Villamil, M. Moreno y J. Jaime. 2009. *Biología molecular, epidemiología y control de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina y de la Diarrea Viral Bovina*. Edición Nacional Universal de Colombia. Instituto de Genética. Facultad de medicina Veterinaria y zootecnia. Colombia.
- Vega, M. S. M. Q., Gómez, J. F. C., Bastidas, M., Márquez, L., & Pons, J. P. (2008). *Detección y tipificación de virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR-RFLP. Obstetricia y Ginecología*, 68(1), 25-31.
- Villacaqui A., T. Eglinton, S. Manchego, O. Alberto y R. Bazán. 2006. Seroprevalencia del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina en bovinos de crianza extensiva en la zona de Cajamarca. *Rev. Investig, Vet Perú*, Jul. Dic 2006, Vol.17, No.2, P.144-147. Issn 1609-9117.
- Vogel, F.S., Flores, E.F., Weiblen, R., Winkelmann, E.R., Moraes, M.P., Braçanca, J.F. (2004). *Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BoHV-1.2): acute balanopostitis, latent infection and detection of viral DNA 74 in region neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation*. *Veterinary Microbiology*. 98(3-4):185-196.
- Wang, J., Horner, G.W., O'Keefe, J.S. (2006) *Genetic characterization of bovine herpesvirus 1 in New Zeland*. *New Zeland Veterinary Journal*. 54(2): 61-66.
- Wang, G., Clark, C. G., Taylor, T. M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., ... & Rodgers, F. G. (2002). *Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of Campylobacter jejuni, C. coli, C. lari, C. upsaliensis, and C. fetus subsp. fetus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12), 4744-4747.

- Wellenberg G., E. Verstraten, M. Mars, and F. Van Oirschot. 1998. *ELISA detection of antibodies to glycoprotein E of bovine herpesvirus 1 in bulk milk samples*. Vet Rec. 142: 219-220.
- Wiedmann, M., Brandon, R., Wagner, P., Dubovi, E. J., & Batt, C. A. (1993). *Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay*. Journal of virological methods, 44(1), 129-139.
- Wilcox, C. L., & Johnson, E. M. (1987). *Nerve growth factor deprivation results in the reactivation of latent herpes simplex virus in vitro*. Journal of virology, 61(7), 2311-2315.
- Wittels, M., & Spear, P. G. (1991). *Penetration of cells by herpes simplex virus does not require a low pH-dependent endocytic pathway*. Virus research, 18(2-3), 271-290.
- Wu, D. Y., UGOZZOLI, L., PAL, B. K., QIAN, J., & WALLACE, R. B. (1991). *The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction*. DNA and cell biology, 10(3), 233-238.
- Yason, C. V., Harris, L. M., McKenna, P. K., Wadowska, D., & Kibenge, F. S. (1995). *Establishment of conditions for the detection of bovine herpesvirus-1 by polymerase chain reaction using primers in the thymidine kinase region*. Canadian Journal of Veterinary Research, 59(2), 94.
- Yuan, S., Cohen, D. B., Ravel, J., Abdo, Z., & Forney, L. J. (2012). *Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome*. PloS one, 7(3), e33865.
- Zacarias R. 2002. Seroprevalencia de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en Bovinos criollos de crianza extensiva de la Provincia de Parinacochas Ayacucho. Tesis UNMSM Perú.
- Zanabria V., H. Rivera, y R. Rosadio. 2000. Etiología del síndrome neumónico agudo en vacunos de engorde en Lima. Rev Inv Vet Perú. 11:67-85.
- Zapata, J. C., Londoño, J. O., Bedoya, G., & Tobon, F. N. Z. (2016). Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB). Caracterización Molecular de una cepa

Colombiana de Herpesvirus Bovino tipo 1. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 15(1), 92-99.

Zeddám, J. L., Carrera, M. V., Barragán, Á., Pollet, A., López-Ferber, M., & Léry, X. (2005). Los virus entomopatógenos para el control de las polillas de la papa: Nuevas perspectivas en el manejo de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). Memorias III Taller Internacional sobre la polilla guatemalteca de la papa, *Tecia solanivora* Cartagena de las Indias, Colombia 16-17 de Octubre 2003.

