

## Detección molecular del gen de la glicoproteína B del virus herpes felino

Constanza Isabel Sepúlveda-Estay,\* María Antonieta Jara-Osorio, Carlos Osvaldo Navarro-Venegas\*\*

Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

**email:** canavarr@uchile.cl

El virus herpes felino tipo 1 genera múltiples problemas y el gato termina con consecuencias que afectan su futura calidad de vida. Este virus está distribuido en todo el mundo y es de fácil transmisión y dado que es un patógeno latente, continúa propagándose sin control a toda la población de gatos. El diagnóstico se basa en los signos clínicos, existiendo hoy en Chile solo un método de diagnóstico de laboratorio específico, implementado para identificar el agente, que no se usa regularmente en la clínica de animales pequeños. Así, el tratamiento y diagnóstico generalmente se basan en el conocimiento y la experiencia del médico veterinario, sin dejar una confirmación real sobre qué agente está causando los síntomas. Esta investigación propuso un método de diagnóstico molecular alternativo a la detección del gen de la timidina quinasa viral, para el cual se seleccionaron gatos menores de 1 año de edad, con síntomas compatibles con una infección con el virus del herpes felino. El método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se utilizó para detectar el gen de la glicoproteína B del virus herpes felino tipo 1, seguido de la determinación del porcentaje de identidad de nucleótidos (PIN) respecto a los datos oficiales del GenBank®. De los 11 gatos estudiados, en solo uno de ellos se pudo amplificar un segmento que correspondía al gen de la glicoproteína B. El PIN resultante (>96%) confirma que la secuencia obtenida corresponde al gen de la glicoproteína B tipo 1 del virus del herpes felino y se discute la eficiencia del método implementado.

**Palabras clave:** PCR; enfermedades de los gatos; bases de datos de ácidos nucleicos; virus herpes felino tipo 1.

### Introducción

El virus herpes felino tipo 1 (VHF-1) se distribuye en todo el mundo, se conoce solo un serotipo y la virulencia puede cambiar entre distintas cepas del virus. Es un virus ADN bicatenario, con un tamaño entre 120 y 280 nm y su estructura la componen el material genético (genoma), una cápside icosaédrica, el tegumento y una envoltura lipídica que contiene varias proteínas de membrana y glicoproteínas virales. Pertenece al orden *Herpesvirales*, familia *Herpesviridae*, a la subfamilia *Alfaherpesvirinae* y al género *Varicellovirus*, que tienden a ser altamente especie-específicos y extremadamente susceptibles a los desinfectantes de rutina empleados en la clínica de animales pequeños. Este virus posee características que incluyen un rango reducido de hospedadores, un ciclo reproductivo corto, con invasión rápida en cultivos celulares, destrucción eficiente de células infectadas y la capacidad de establecer infecciones en los ganglios sensoriales primarios.<sup>(1,2)</sup>

Al igual que otros herpesvirus, el VHF-1 sintetiza numerosas glicoproteínas que luego se incorporan a las membranas de las células infectadas y a la envoltura

del virión. Estas glicoproteínas se han caracterizado y se conservan entre diferentes virus herpes relacionados. Las glicoproteínas del virus herpes median la unión del virión a la célula hospedadora y son extremadamente importantes en la infectividad viral, determinando aún más la especificidad según el subtipo de virus. Estas también son críticas para la respuesta inmune del paciente contra la infección. Se pueden dividir en glicoproteínas esenciales, cuya presencia se requiere para la replicación viral productiva en un cultivo celular, y glicoproteínas no esenciales, que son indispensables en cierta medida para la propagación viral en cultivos celulares.<sup>(3,4)</sup>

Según la secuenciación del ADN, la glicoproteína B (gB) consta de 904 aminoácidos, incluida la señal de secuencia N-terminal. El gen gB está altamente conservado en todas las subfamilias de herpesvirus y codifica para una glicoproteína de membrana.

Hay evidencia de que gB juega un papel importante en los fenómenos de fusión de membrana durante la entrada del virus en la célula y también durante la fusión celular inducida por el virus. Esto se expresa

\* Médico veterinario.

\*\* Bioquímico, Magister en Ciencias Veterinarias, Profesor Asistente, Universidad de Chile.

conjuntamente con otras glicoproteínas (D, H y L), todas actuando secuencialmente, donde la glicoproteína D está involucrada en la fase I (unión del virus a la superficie celular), la glucoproteína H/L en la fase II (interacción de la glicoproteína D con un receptor de entrada) y gB en fase III (fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula, liberando el complejo cápside-tegumento en el citoplasma de la célula infectada). La función de gB es esencial para la entrada en las células diana, tanto para la infección por viriones libres como para la diseminación directa de célula a célula. Por esta razón, los viriones gB negativos son biológicamente inertes.<sup>(4,5)</sup>

El complejo respiratorio felino es una patología que afecta comúnmente a los gatos domésticos y los principales agentes patógenos asociados a esta enfermedad son dos virus altamente contagiosos: virus herpes felino tipo 1 (VHF-1) y calicivirus. Si bien el gato doméstico es el principal hospedador del VHF-1, el virus también ha sido aislado de guepardos y leones; se han detectado anticuerpos en pumas y no existe evidencia de infección en humanos.<sup>(1,6)</sup>

Esta patología se presenta especialmente en gatos pequeños menores de 6 meses, momento de la vida en el cual poseen un sistema inmune poco desarrollado. Debido a la naturaleza de su transmisión, se presenta sobre todo en animales que viven en criaderos, centros de rescate o albergues.

Estos ambientes muchas veces contienen una mezcla de gatos portadores más viejos y animales más jóvenes susceptibles. Los gatos son mantenidos en alta proximidad, permitiendo la rápida diseminación viral entre los animales, y muchos de los factores estresantes que son conocidos como causantes de la reactivación del virus están presentes. Entre éstos, se incluyen cambios en el hogar, parto, amamantamiento y después de la administración de terapia inmunosupresiva o corticoesteroides.<sup>(2,5)</sup>

La forma de transmisión es por contacto directo, siendo las dos vías más comunes a través de gatos con infección aguda que liberan el virus al medio ambiente y a través de gatos con infección latente que están experimentando reactivación del virus y con ello diseminación al exterior. La infección transplacentaria no ha sido comprobada en la práctica. Las hembras con infección latente pueden transmitir el virus a sus camadas, ya que el parto y lactancia inducen periodos de estrés que pueden llevar a la reactivación del virus y con ello su liberación al medio ambiente.

Por esta razón, los gatos pequeños pueden adquirir el virus muy tempranamente en su vida.<sup>(1)</sup>

El VHF-1 es un virus neuroepiteliotrópico, con afinidad por neuronas sensitivas y tejidos epiteliales, produce infección latente localizándose en el ganglio trigémino, desde donde pueden ocurrir infecciones oculares recrudescientes por la reactivación del virus, el cual viaja a través de los axones de la rama oftálmica del nervio trigémino hacia el ojo.<sup>(7,8)</sup> Existe evidencia que sugiere que en muchas especies, incluyendo el gato, el herpesvirus podría estar presente en forma latente o inactiva en la córnea. Un alto porcentaje de gatos clínicamente normales han presentado ADN de VHF-1 en la córnea y conjuntiva. La reactivación muchas veces ocurre después de periodos de estrés naturales que pueden ocurrir en los animales.<sup>(7,9)</sup>

Los signos clínicos agudos ocurren principalmente en gatos pequeños expuestos por primera vez al virus, los cuales desarrollan fiebre, letargia, inapetencia, estornudos, tos, descarga nasal y conjuntivitis con descarga ocular. La severidad de los signos varía según la cepa viral y tipo de exposición, edad de los gatos afectados, estado inmune y susceptibilidad individual. Los signos oculares incluyen conjuntivitis, úlceras corneales, queratitis estromal, secuestro corneal y queratoconjuntivitis seca. Se han descrito abortos por este virus, y en neonatos la muerte es por encefalitis y hepatitis necrotizante focalizada.<sup>(10)</sup>

El VHF-1 tiende a localizarse solamente en la vía respiratoria alta no sobrepasando el área de laringotráquea. Una vez ocurrida la infección primaria, el virus replica en las membranas mucosas de la nariz, laringe, tráquea y tracto genital, pero también en las conjuntivas. Después de un período de incubación de 24 a 48 h empiezan los signos clínicos agudos mencionados anteriormente.

La queratitis asociada con úlceras corneales perforadas es común. En gatos pequeños plenamente susceptibles de hasta 4 semanas de edad, la rinotraqueítis extensa y una bronconeumonía asociada pueden ser fatales. La infección por VHF-1 en gatos mayores a 6 meses de edad es probable que resulte en una infección leve o subclínica. Las hembras preñadas pueden abortar, aunque no existe evidencia que el virus cruce la placenta e infecte de manera fatal al feto; además, el virus no ha sido aislado desde placentas o fetos abortados.<sup>(10)</sup>

El diagnóstico presuntivo de la infección con VHF-1 se realiza muchas veces en base a los signos clínicos

presentados. Ésta puede ser presumida cuando se observan úlceras dendríticas, que corresponden a lesiones patognomónicas en el animal afectado. La confirmación de la infección con VHF-1 requiere detección del virus en el laboratorio. Esta confirmación permite descartar la afección por parte de otros agentes infecciosos potenciales, así como también guiar el curso del tratamiento a realizar.<sup>(9)</sup>

Existen cuatro técnicas diagnósticas de laboratorio que se emplean para la detección de VHF-1: aislamiento viral, técnica de anticuerpos fluorescentes, técnicas serológicas, y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El aislamiento viral detecta virus viable y no solo su ADN, el cual es cultivado a partir de torulados o raspados conjuntivales, nasales y faríngeos. Éste se considera el diagnóstico estándar de oro para el virus ya que replica rápidamente en las células y además produce efectos citopáticos característicos en el cultivo celular.<sup>(2)</sup> Las muestras deben ser obtenidas antes de la aplicación de fluoresceína o rosa de bengala, para la observación de úlceras en el paciente, ya que estas sustancias pueden inactivar el virus debido a que el pH que presentan podría alterar la composición lipoproteica de la envoltura.<sup>(11)</sup>

Las muestras deben ser enviadas de inmediato o bajo refrigeración al laboratorio, lo que se convierte en una dificultad en la aplicación práctica. La gran desventaja de este diagnóstico es su lentitud en comparación con otras técnicas.<sup>(2)</sup> La técnica de anticuerpos fluorescentes detecta proteínas específicas del virus a través de anticuerpos marcados con fluorescencia. Las muestras pueden ser tomadas tanto de frotis como biopsias conjuntivales o corneales y se debe evitar la administración de fluoresceína, ya que esta puede dar resultados falsos positivos.<sup>(1)</sup>

Las principales limitaciones de esta técnica son su baja sensibilidad y especificidad, así como la subjetividad del análisis de resultados con respecto a la determinación de fluorescencia. Durante las infecciones crónicas y recurrentes, las dos pruebas mencionadas anteriormente muchas veces producen resultados negativos.<sup>(2)</sup> Las pruebas de detección de anticuerpos séricos (ELISA y pruebas de anticuerpos neutralizantes) se pueden realizar a partir de muestras de suero, humor acuoso y fluido cerebrospinal.<sup>(1,12)</sup>

Así, la técnica de detección de ADN basada en PCR,<sup>(13)</sup> ha sido extremadamente útil en el diagnóstico de VHF-1. Esta técnica es sensible, con tasas de detección que van desde 50-100% para VHF-1 y específica, ya que detecta parte del genoma del patógeno de interés, pudiendo

utilizarse en la detección de ADN viral desde muestras de los diferentes órganos afectados.<sup>(14,15)</sup> La especificidad se logra al diseñar partidores que se unan al blanco y que sean del largo suficiente para que su secuencia sea única en el genoma. La sensibilidad es debido a que detecta cantidades pequeñas de virus presentes en la muestra.<sup>(8)</sup>

Actualmente en Chile existe sólo una prueba de diagnóstico en laboratorio para detectar VHF-1, que utiliza la detección del gen de la timidina quinasa (gen TQ);<sup>(16)</sup> por lo tanto, en este trabajo pretendemos implementar una técnica molecular alternativa para detectar el gen gB del VHF-1, como aporte al diagnóstico clínico.

## Materiales y Métodos

El proceso práctico fue realizado en los laboratorios de Virología y Microbiología Animal pertenecientes al Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

**Muestras.** En este trabajo se utilizaron las muestras que resultaron positivas a VHF-1 en el estudio que permitió la implementación de la detección del gen TQ de VHF-1,<sup>(16)</sup> cuyo origen corresponde a 11 gatos raza doméstico pelo corto, sin vacunación previa y menores de 1 año. Estos animales cursaron un cuadro clínico agudo sospechoso de infección por VHF-1 y con signos clínicos típicos: fiebre, conjuntivitis unilateral o bilateral, secreción mucopurulenta nasal y ocular, así como úlcera corneal. Para obtener la muestra se raspó suavemente con un hisopo estéril la mucosa conjuntival ventral de uno (muestras de gatos 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 y 11) o ambos ojos afectados (muestras de gatos 1 y 5), sin limpieza previa del ojo a muestrear. Luego, dentro de un plazo de 24 h, se homogeneizó mediante un “vortex” el contenido del hisopo en un tubo con 200 µL de solución buffer salina fosfatada 0,15 M, pH 7,2; refrigerada a 4°C hasta el momento de realizar la prueba de PCR.

**Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).** La muestra directa, desde los animales afectados, se utilizó sin requerir una extracción previa del ADN viral. Partidores: se utilizaron partidores para amplificar el gen gB del VHF-1 y que generan un fragmento de 737 pares de bases,<sup>(14)</sup> los cuales fueron encargados a la empresa Bioscan® (EE.UU.) para su elaboración. Los partidores utilizados fueron los siguientes:

Partidor 1 5'-CCTAAACCTACTTCGGATGA-3'

Partidor 2 5'-GGCTTTAAATGAACTTCTCTGG-3'

**Mezcla de reacción.** Se utilizó un kit comercial 2X PCR Master Mix (Fermentas®, EE.UU.), que contiene la polimerasa termoestable, los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), el buffer de reacción y MgCl<sub>2</sub>. Para hacer la mezcla de reacción se utilizaron 15 µL de 2X PCR Master Mix, 5 µL de cada uno de los partidores y 5 µL de la muestra, con lo que se obtuvo un volumen total de 30 µL.

**Amplificación del ADN.** Se utilizó un termociclador Apollo (CLP, EE.UU.) de 96 pocillos de 0,2 mL. Se realizó un PCR cuyo protocolo consideró 35 ciclos (desnaturalización a 95°C por 2 min; alineamiento a 59°C por 1 min; extensión a 72°C por 1 min) y una etapa de elongación final a 72°C durante 10 min.<sup>(16)</sup>

**Visualización de los productos amplificados.** Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Wrinkler®, EE.UU.) en buffer Tris-borato (90 mM Tris-borato, 10 mM EDTA, pH 7,2). La electroforesis fue realizada a 90V por 45 min. Como marcador de tamaño molecular se utilizó un estándar que contiene fragmentos de ADN de entre 100 y 2000 pares de bases (Fermentas®, EE.UU.).

Después de realizada la electroforesis, el gel fue sometido a incubación en bromuro de etidio (0,5 µg/mL) (Fermelo®, Chile) y las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminator UVP®) para luego ser fotografiadas.

**Controles.** Como control positivo se utilizó el contenido de la vacuna triple felina Feligen CRP® (Virbac, Francia), la cual contiene virus atenuado de calicivirus felino, virus de la panleucopenia felina y virus de la rinotraqueítis felina, que corresponde al virus herpes felino en una concentración de 105-107 DICT50 (Dosis Infectante de Cultivo de Tejidos 50%).

El contenido de la vacuna se resuspendió en 500 µL del diluyente recomendado por el fabricante. Como control negativo se utilizó una muestra de torulado ocular de un gato sano de 2 años de edad.

**Medidas de Bioseguridad.** El estudio se realizó de acuerdo a las reglas de bioseguridad establecidos para el laboratorio de virología animal, las que incluyen el uso de material limpio, eliminación de los desechos y utilización de delantal blanco cerrado y guantes durante el desarrollo del trabajo práctico. Para poder visualizar los geles se utilizó una placa de acrílico y gafas con filtro UV, y luego de su uso, los geles incubados en bromuro de etidio se eliminaron mediante el uso de incineración, ya que el químico tiene propiedades mutagénicas.

## **Determinación de la identidad nucleotídica respecto a secuencias almacenadas en el GenBank® (NIH, EE.UU.)**

a) Secuenciación: el fragmento de ADN purificado obtenido luego del ensayo PCR fue enviado al centro de secuenciación de la empresa Genytec Limitada (Chile).

b) Análisis: una vez recibidos los resultados, se analizaron las secuencias utilizando el programa online de acceso libre Clustal Ω, y el porcentaje de identidad nucleotídica (PIN) se obtuvo mediante BLAST (del inglés “Basic Local Alignment Search Tool”), programa informático de alineamiento de secuencias (Institutos Nacionales de Salud, EE.UU.).

## **Resultados**

**PCR.** Al realizar la PCR se pudo observar que solo una de las 14 muestras generó un fragmento de ADN de un tamaño cercano a los 700 pares de bases, logrando una banda visible nítida y ancha en el gel. Se obtuvo una sola banda en el carril correspondiente, lo que indica que no hubo amplificación inespecífica. El control positivo no generó una banda, y por lo tanto, no pudo ser observada (Fig. 1).

**Análisis del fragmento secuenciado.** El amplificado obtenido como resultado del ensayo PCR fue secuenciado de manera exitosa, obteniendo cuatro secuencias de ADN similares con las cuales se realizó un alineamiento múltiple de secuencias, lo cual permitió obtener una secuencia de consenso CSE que luego BLAST comparó con los registros oficiales online de GenBank® (NIH, EE.UU.). El resultado obtenido demostró un valor de PIN>96% para un genoma completo de VHF-1 o un fragmento de 3.240 pb del gen gB del VHF-1 (Fig. 2).

## **Discusión**

Los resultados demuestran que efectivamente la técnica utilizada permite la detección del gen gB de VHF-1. A pesar de esto, no se puede afirmar que esta técnica sea de elección para la detección del virus, pues del total de 14 muestras utilizadas, incluyendo al control positivo, sólo la muestra número cinco fue positiva con una banda ancha y nítida (Fig. 1). No obstante, el tamaño de banda obtenido de aproximadamente 737 pb, la ausencia de otras bandas visibles en el gel, y el alto porcentaje de identidad nucleotídica (96%) del fragmento secuenciado, indican que los partidores utilizados son específicos para el gen gB del VHF-1.

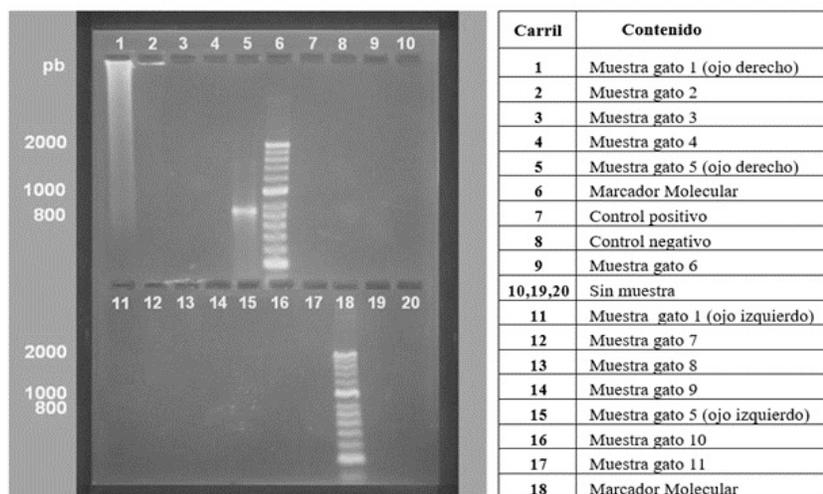


Fig. 1. Electroforesis en gel de Agarosa 2%.

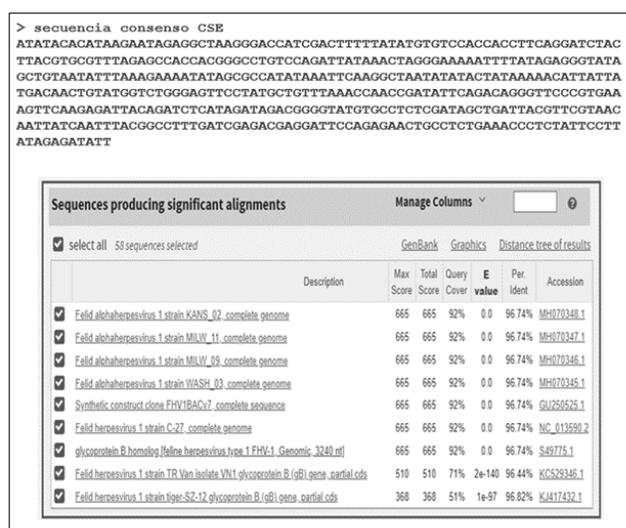


Fig. 2. Secuencia consenso CSE y PIN determinado por BLAST.

La única muestra positiva obtenida correspondió al gato 5 (ojo derecho), gato que presentó los signos clínicos más severos visibles al momento de la obtención de muestra, presentando incluso blefaroespasmó y epistaxis. Considerando lo anterior, se podría relacionar directamente la cantidad de virus presente con la aparición de la banda en el gel de agarosa. Por esta razón se puede asumir que la cantidad y gravedad de los signos clínicos, tienen directa relación con la cantidad de virus excretado por el paciente.

En estudios previos realizados respecto a la sensibilidad de PCR, se discute que la detección del virus puede variar según la cantidad de virus presente en la muestra. Los gatos infectados por VHF-1 excretan el virus en diferentes cantidades durante las distintas etapas de la enfermedad y se plantea que durante la infección aguda es el momento en que se excreta mayor concentración del

virus, disminuyendo al tornarse crónica o recrudescente.<sup>(14)</sup> Por lo tanto, una explicación posible sería la nula o baja carga viral presente en las muestras; sin embargo, esta posibilidad no sería considerada, pues esas mismas muestras resultaron positivas según el protocolo que involucra la detección del gen TQ de VHF-1.<sup>(16)</sup>

Nuestros resultados apuntan a la descripción de un protocolo de PCR con inconvenientes a solucionar, teniendo en cuenta que es valorado como alternativa a la detección del gen TQ,<sup>(16)</sup> pues se utilizaron las mismas muestras que permitieron la implementación exitosa del protocolo ya mencionado, por lo que deben revisarse algunos factores que pueden afectar la detección mediante PCR, como el número de ciclos utilizados, el diseño o selección de los partidores, la composición del buffer de reacción, las temperaturas de los ciclos y la presencia de inhibidores de PCR en la muestra.<sup>(2)</sup>

Así, hasta este momento, sugerimos seguir utilizando como blanco de detección al gen TQ.

Lo anterior concuerda con el estudio realizado por Maggs y Clarke,<sup>(4)</sup> donde se compararon seis protocolos de PCR simples y anidados para el gen TQ, dando como resultado que la sensibilidad del protocolo está directamente relacionada con el número de ciclos realizados. Es decir, a mayor número de ciclos, mayor sensibilidad. El protocolo que resultó con mayor sensibilidad fue el que realizaba 70 ciclos y el de menor sensibilidad el que empleaba 35 ciclos. En este trabajo se empleó un protocolo de 35 ciclos; por lo tanto, esto podría ser una de las causas de la baja sensibilidad obtenida. La inhibición puede originarse por distintas razones, dentro de las cuales se mencionan condiciones de reacción poco controladas, fallas en la toma de muestra, contaminantes en los reactivos y contenedores, así como la contaminación no intencional durante la preparación de la reacción. Si bien los inhibidores de la PCR, que en general corresponden a compuestos que pueden interferir con la Taq Polimerasa o bien a compuestos quelantes de  $Mg^{+2}$ , han sido poco estudiados, estos pueden ocasionar la falla total de la reacción o la disminución de la detección.<sup>(17)</sup>

En Chile no existen métodos implementados en clínica de animales pequeños para la detección del VHF-1, a pesar de ser una patología frecuente dentro de la población de gatos. Los resultados del presente estudio permiten enfatizar la búsqueda de protocolos con mayores tasas de detección. Algunos autores plantean que la mejor técnica de detección hasta el momento es la utilización de PCR,<sup>(14,15)</sup> siendo el protocolo más ampliamente utilizado la detección del gen TQ. El gen gB ha sido menos estudiado y utilizado en diagnóstico en gatos; no obstante, existe evidencia de su uso para la detección de herpesvirus en otras especies animales y también en el hombre.<sup>(18,19)</sup>

Para el diagnóstico de la traqueobronquitis canina se utiliza la detección del gen gB para detectar al virus herpes canino tipo 1. Un estudio realizado en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile demostró una alta tasa de detección del PCR convencional, dando como resultado un 100% en las muestras analizadas.<sup>(20)</sup> En otro estudio, desarrollado para detectar la glicoproteína del herpesvirus 4 en leche de bovinos, se obtuvo una tasa de detección de 93%.<sup>(19)</sup> Con estos datos se puede concluir que la detección mediante PCR convencional del gen gB, proteína esencial en la entrada del virus a la

célula hospedadora, es utilizada en otras especies con un alto porcentaje de éxito.

El protocolo de PCR descrito permite la detección del gen gB del VHF-1, validado por el alto valor de PIN obtenido (>96%). No obstante, por ahora, no resultaría ser el método diagnóstico de elección en las condiciones aplicadas, debido a su baja sensibilidad y se sugiere la implementación de protocolo similar al desarrollado por Macías y Navarro.<sup>(16)</sup>

Para mejorar la tasa de detección utilizando el gen gB como blanco de detección debe estudiarse el empleo de un PCR anidado. Esta técnica utiliza un primer par de partidores que amplifican por varios ciclos iniciales un fragmento de ADN, que luego es usado como plantilla para una segunda reacción, utilizando un segundo par de partidores.<sup>(16)</sup> Esta reacción es altamente sensible ya que el segundo par de partidores sirve para verificar la especificidad del producto obtenido en los primeros ciclos.

## Referencias

1. Thiry E, Addie D, Belak S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, et al. Feline herpesvirus infection. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg*. 2009;11:547-55.
2. Maggs D, Clarke H. Relative sensitivity of the polymerase chain reaction assays used for detection of feline herpesvirus and commercial vaccines. *Am J Vet Res*. 2005;66:1550-5.
3. Maes R. Felid herpesvirus type 1 infection in cats: a natural host model for alpha herpesvirus pathogenesis. *ISRN Vet Sci*. 2012;2012:495830. doi:10.5402/2012/495830.
4. Maeda K, Horimoto T, Mikami T. Properties and functions of feline herpesvirus type 1 glycoproteins. *J Vet Med Sci*. 1998;60:881-8.
5. Böhm SW, Backovic M, Klupp BG, Rey FA, Mettenleiter TC, Fuchs W. Functional characterization of glycoprotein H chimeras composed of conserved domains of the pseudorabies virus and herpes simplex virus 1 homologs. *J Virol*. 2015;90(1):421-32.
6. Maazi N, Jamshidi S, Kayhani P, Momtaz H. Occurrence of *Chlamydomyces felis*, feline herpesvirus 1 and calicivirus in domestic cats of Iran. *Iran J Microbiol*. 2016;8(5):312-5.
7. Townsend WM, Jacobi S, Tai SH, Kiupel M, Wise AG, Maes RK. Ocular and neural distribution of feline herpesvirus-1 during active and latent experimental infection in cats. *BMC Vet Res*. 2013;9(1):185. doi: 10.1186/1746-6148-9-185.
8. Stiles J, Pogradichny R. Detection of virulent feline herpesvirus-1 in the corneas of clinically normal cats. *J Feline Med Surg*. 2008;10(2):154-9.
9. Sandmeyer L, Waldner C, Bauer B, Wen X, Bienzle D. Comparison of polymerase chain reaction tests for diagnosis of feline herpesvirus, *Chlamydomyces felis*, and *Mycoplasma* spp. infection in cats with ocular disease in Canada. *Can Vet J*. 2010;51:629-33.

10. Versteegen J, Dhaliwal G, Versteegen-Onclin K. Canine and feline pregnancy loss due to viral and non-infectious causes: a review. *Theriogenology*. 2008;70(3):304-19. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.05.035.
11. Su TY, Chang SW, Yang CJ, Chiang HK. Direct observation and validation of fluorescein tear film break-up patterns by using a dual thermal-fluorescent imaging system. *Biomed. Opt. Express* 2014;5(8):2614-9.
12. Realegeno S, Niezgodá M, Yager PA, Kumar A, Hoque L, Orciari L, et al. An ELISA-based method for detection of rabies virus nucleoprotein-specific antibodies in human antemortem samples. *PLoS ONE* 2018;13(11):e0207009. doi: 10.1371/journal.pone.0207009.
13. Mullis K, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
14. Vögtlin A, Fraefel C, Albini S, Leutenegger C, Schraner E, Spiess B, et al. Quantification of feline herpesvirus 1 DNA in ocular fluid samples of clinically diseased cats by real-time Taqman PCR. *JCM* 2002;40:519-23.
15. Stiles J, Mcdermott M, Willis M. Comparison of nested polymerase chain reaction, virus isolation, and fluorescent antibody testing for identifying feline herpesvirus in cats with conjunctivitis. *Am J Vet Res.* 1997;58:804-7.
16. Macías P, Navarro C. Molecular detection of feline herpesvirus by means polymerase chain reaction. *Dairy and Vet Science J* 2018;8(3):555736. doi: 10.19080/JDVS.2018.08.555736.
17. Wu J, Ye F, Cui M, Shibata R, Xu R, Cheng L, Zhang DY. *Diagnostic Methodology and Technology in Molecular Genetic Pathology*. En: Cheng L, Zhang DY, Eble JN. (eds). *Molecular Genetic Pathology*. New York: Springer; 2013. p. 211-300.
18. Thomasy SM, Maggs, DJ. A review of antiviral drugs and other compounds with activity against feline herpesvirus type 1. *Vet Ophthalmol.* 2016;19(Suppl 1):119-30.
19. Wellenberg G, Verstraten E, Belák S, Verschuren S, Rijsewijk F, Peshev R, Van Oirschot J. Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase DNA by PCR assays in bovine milk. *J Virol Methods* 2001;97:101-12.
20. Fuentes A, Carrasco L, Vargas M, Valenzuela C, Céspedes PF, Navarro C. Genomic characterization of canine herpes virus, the etiological agent of fatal hemorrhagic disease in newborn puppies. *EMS Veterinary J* 2018;1(1):003. Disponible en: <https://www.emspublishers.org/article.php?articleId=18>.

---

## Molecular detection of glycoprotein B from feline herpesvirus

### Abstract

The feline herpesvirus type 1, generates multiple problems and the cat ends with consequences that affect its future quality of life. This virus is distributed throughout the world and is easily transmitted and since it is a latent pathogen, it continues to spread uncontrollably to the entire cat population. The diagnosis is based on clinical signs, today there is only a specific laboratory diagnostic method implemented in Chile to identify the agent, which is not used regularly in the clinic of small animals. Thus, the treatment and diagnosis are usually based on the knowledge and experience of veterinarian without leaving a real confirmation about which agent is causing the symptoms. This research proposed a molecular diagnostic method alternative to thymidine kinase detection gene, for which cats under 1 year of age were selected, with symptoms compatible with an infection with the feline herpesvirus. The Polymerase Chain Reaction (PCR) method was used to detect the feline herpesvirus type 1 glycoprotein B gene, followed by the determination of the percentage of nucleotide identity (NIP) from official GenBank® data. Of the 11 cats studied, only one of them resulted in the amplification of a segment corresponding to the glycoprotein B gene. The resulting NIP (> 96%) confirms that the sequence obtained corresponds to type 1 glycoprotein B gene of feline herpesvirus and the efficiency of the method implemented is discussed.

**Keywords:** PCR; cat diseases; databases nucleic acid; feline herpesvirus type 1.

---

*Recibido: 21 de Agosto de 2019*

*Aceptado: 17 de Septiembre de 2019*