

Estandarización de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del herpes virus bovino-1 (HVB-1) en semen

RODAS JD MV.MS., ZULUAGA FN MV.MS, OSSA JE MV. PhD.*

Resumen

El HVB-1 puede excretarse en semen de animales seropositivos pero la frecuencia de excreción y el impacto de esta vía de transmisión no han sido aclaradas. Para contribuir a esta discusión se hizo un esfuerzo por estandarizar una prueba de PCR para HVB-1 en semen.

Como otros autores lo habían informado, encontramos que el semen contiene factores inhibidores de la reacción que hacen que, cuando no se trabaja con DNA purificado, sea necesaria la dilución de la muestra hasta 1:6000 para poder lograr la amplificación del DNA viral. Con el objeto de aumentar la posibilidad de detección de la banda de DNA viral esperada, se utilizó un Southern Blot con una sonda obtenida a partir del polinucleótido amplificado por los cebadores respectivos, marcada con P32. Los ensayos preliminares muestran un nivel de detección 100 veces mayor.

A pesar de la alta dilución de la muestra de semen que reduce notoriamente la posibilidad de detección del PCR, esta prueba permitió la detección del virus en muestras de campo procedentes de un brote de enfermedad compatible con RIB.

La prueba de PCR para la detección del HVB-1 en semen podría tener su mayor impacto en el control de calidad de programas de congelación de semen, inseminación artificial y transferencia de embriones; adicionalmente podría ser de utilidad para definir el verdadero impacto de esta vía de transmisión.

Introducción

El HVB-1 causante de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (RIB), produce una de las infecciones virales más prevalentes del ganado a nivel mundial generalmente acompañada de trastornos respiratorios y reproductivos (1).

Como todos los alfa herpesvirus, el virus de la RIB produce infecciones latentes a nivel de los ganglios nerviosos periféricos, particularmente trigémino y sacro, donde puede persistir por toda la vida del animal. Por mecanismos no muy bien conocidos inducidos por diversos estímulos tales como estrés o tratamiento con corticosteroides, el virus puede ser reactivado y secretado (8,9).

De acuerdo con lo anterior los toros infectados con el HVB-1 se consideran portadores de por vida y potenciales diseminadores de la infección. El virus puede replicarse en la mucosa de prepucio, pene y en la parte distal de la uretra (10), lo que favorece que el semen se pueda contaminar durante la eyaculación; las consecuencias de esta situación no han sido esclarecidas completamente y podrían ser variables dependiendo del estado inmunológico de la hembra.

Aunque realmente no se sabe que tan frecuente es la presencia del virus en el semen de toros infectados, en Colombia la legislación prohíbe el uso de toros o semen infectados en programas de inseminación artificial. No obstante, la aplicación de esta Ley se dificulta por la imposibilidad de distinguir animales infectados de animales vacunados. Adicionalmente, el aislamiento viral a partir de semen se hace difícil por la toxicidad de la muestra para los cultivos celulares (4,12,14).

* Programa de Reproducción, Laboratorio de Virología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, AA 1226. Medellín, Colombia.
Investigación financiada por Colciencias y la Universidad de Antioquia

La literatura informa que se requieren por lo menos 100 partículas virales para conformar una unidad infecciosa; lo que significa que aunque la prueba de aislamiento resulte negativa es posible que exista un pequeño número de partículas que, in vivo, tengan capacidad infecciosa (10). Esto ha motivado que algunos programas de erradicación en países europeos adopten la técnica de PCR para la detección del virus en semen (10,11,13).

En este estudio se pretendió estandarizar técnicas moleculares, más sensibles y específicas (5,10,11,13), como un instrumento para adelantar estudios básicos sobre la dinámica de la infección latente en bovinos, para mejorar el diagnóstico y, eventualmente, para contribuir al control o erradicación de la infección.

Materiales y Métodos

Virus y células. Se utilizó el HVB-1 obtenido de la Universidad de Wisconsin, y replicado en células MDBK (Marvin Darby Bovine Kidney) (ATCC 22). Las monocapas de estas células fueron infectadas con el HVB-1, y cuando se obtuvo un efecto citopático (ECP) del 80%, las células fueron sometidas a congelación, descongelación y centrifugación para obtener, el sobrenadante "*clarificado*" que se consideró el virus "*stock*". Este virus fue posteriormente titulado de acuerdo a las técnicas convencionales (2,15) y su título fue 10^4 .

Muestras de semen: para realizar las pruebas preliminares se dispuso de muestras de semen fresco mantenidas en refrigeración (4°C) obtenidas de toros seronegativos de la granja "*San Pablo*" de la Universidad Nacional de Colombia (Seccional Medellín). Adicionalmente se congeló en pajillas, por los métodos clásicos de criopreservación (3), un lote de semen experimentalmente "*contaminado*" con el virus de referencia. Para validar los estudios experimentales se aprovechó la ocasión de un brote de enfermedad compatible con RIB, de donde se obtuvieron muestras de semen (tomadas con electroeyaculador). Estas muestras fueron probadas por aislamiento y por PCR.

Aislamiento viral a partir de muestras de

semen: Para determinar la capacidad de detección viral a partir de muestras de semen se inoculó semen fresco de un animal seronegativo con diluciones virales desde 10^{-1} hasta 10^{-6} . Estas muestras de semen infectado fueron inoculadas sobre cultivos celulares, se incubó durante una hora y luego se retiró el exceso de inóculo y se realizó un lavado de la monocapa celular con PBS. Posteriormente los platos fueron incubados a 37°C durante 3 días. Al cabo de los cuales se hizo la evaluación microscópica para determinar el efecto viral.

Extracción del DNA viral: Se emplearon 3 métodos alternativos de extracción del DNA viral sin llevar a cabo extracción y purificación previa del DNA total: 1) Inicialmente se utilizó el método de congelar y descongelar sucesivamente, por 4 a 5 ciclos, las muestras de virus diluido en medio, en agua o en semen, 2) En un ensayo diferente, se trataron las muestras en una proporción 1:30 (10ul de muestra : 300ul suspensión) con una solución de trabajo formada por: Chelex-100 al 20% (Bio-rad), Duodecil Sulfato de Sodio (SDS-Sigma) al 0.1%, Nonidet P40 (NP40) y Tween (Merck) 20 al 1%. La mezcla fue fuertemente agitada en vortex, se calentó a $100^{\circ}\text{C}/12\text{min}$, se centrifugó a 10.000 rpm/12min. y posteriormente se tomaron 10 ul del sobrenadante para llevar a cabo la PCR (7). 3) El último de los métodos fue realizado agregando a 100ul de muestra, 100ul de una suspensión que contenía 200ug/ml de proteína K y llevando la mezcla a incubación por 3h/ 56°C . Luego de esto la solución era sometida a ebullición por 10min y luego centrifugada a 10.000 rpm/10min. Finalmente, la PCR se llevó a cabo con 10ul del sobrenadante obtenido.

Amplificación de DNA: Se siguió la técnica de Van engelenburg cols (10), que fue realizada en el laboratorio con algunas modificaciones: en una mezcla final de 50ul de reacción se agregaron los siguientes elementos: 100mM de tris-Hcl (pH 8.3), 500mM de KCl, 0.01% de gelatina (Buffer de PCR, GIBCO), 2 mM de MgCl_2 (GIBCO), 0.2 mM de dNTPs (PROMEGA), 0.1 uM de cada primer (p1 : CTGCTGTTCGTAGCCCACAACG y p 2 : TGTGACTTGGTGCCCATGTCGC, sintetizados

por DNAgency) correspondientes a una secuencia génica que codifica para la glicoproteína C del HVB-1 y 20 U/ml de Taq polimerasa. Adicionalmente se agregó 25 ul/mezcla de aceite mineral puro para evitar la evaporación de las muestras (10,11).

Las mezclas para PCR fueron sometidas inicialmente a un ciclo de 94° por 5' para la separación de las bandas de ADN.

La amplificación fue llevada a cabo mediante 38 ciclos sucesivos en el siguiente orden: 15 ciclos de 95°C/1', 60°C/1' y 72°C/1', seguidos de 23 ciclos de 95°C/1', 60°C/1' y 72°C/1' más un segmento de autoextensión de 4". En cada una de las pruebas se hizo además, un control positivo con HVB-1 sin diluir, un control de reactivos y un control de la reacción con molde y cebadores del fago lambda. Luego las muestras obtenidas del PCR se almacenaron a 4°C. hasta su análisis (10,11).

Análisis de productos del PCR: el producto amplificado se visualizó por electroforesis en geles de agarosa al 2% bajo fluorescencia con bromuro de etidio. Se empleó como marcador de peso molecular un plásmido que contenía una serie de 15 polinucleótidos con tamaños crecientes de 100 en 100 hasta 1500 pares de bases (pb) (Gibco) para verificar el tamaño del segmento amplificado. La banda buscada tenía un peso molecular de 173 pares de bases y correspondía a la amplificación de un segmento que codifica para la gp C (10).

Prueba de aislamiento y PCR en muestras de campo: posteriormente, tanto el aislamiento como la PCR fueron ensayados en 4 muestras de semen de toros seropositivos y 4 pajillas de semen congelado, de toros seronegativos. 3 de las 4 muestras de semen de toros seronegativos fueron previamente contaminadas en forma experimental con 1DICC 50. Para el aislamiento viral, ambos tipos de muestras fueron diluidas 1:100 en medio de mantenimiento (MEM + SFB 2%) y para la PCR, las muestras de semen fresco fueron tratadas con proteinasa K de acuerdo a la metodología anteriormente descrita y las de semen congelado fueron diluidas 1:400 y 1:600. Igualmente fueron probados en

algunos de los ensayos, los genomas de otros herpesvirus humanos disponibles en nuestro laboratorio tales como el herpes simplex-2, el virus de la Varicella-Zoster y el Citomegalovirus Humano, con el fin de verificar la especificidad de los cebadores utilizados en la prueba.

Ensayos de Southern Blot: Con el propósito de aumentar la sensibilidad de la PCR desarrolló una sonda propia a partir de la fusión del fragmento de gel que contenía el segmento amplificado. Posteriormente este segmento fué marcado con fósforo radioactivo (p32), y se realizó un "Southern blot" sobre membranas de nylon. La técnica utilizada fué la siguiente: para la transferencia del DNA amplificado a soportes de papel, los geles de agarosa fueron desnaturalizados por 30 min. a temp. amb. en una solución con NaOH 0.5M y Na Cl 0.6M. (10).

A continuación fueron colocados en forma invertida sobre papel de celofán y encima una membrana de nylon (Amersham) previamente desnaturalizada en la misma solución por 5 min, esta última fué a su vez cubierta con dos papeles de filtro Whatman también prehumedecidos en la solución desnaturalizante y finalmente presionadas para facilitar el contacto entre la superficie del gel y la membrana. Luego de 12 a 24h fueron marcados sobre la membrana los pozos correspondientes a las diferentes muestras y el DNA transferido a las membranas fue fijado por exposición a los rayos ultravioletas del transiluminador por 5 min.

Los geles fueron también examinados en el transiluminador para constatar el éxito de la transferencia por ausencia del DNA en ellos (10).

Posteriormente las membranas fueron empacadas en bolsas para hibridización (Kapak/Scotchpak) y sometidas a prehibridización en 20cc de una solución con formamida al 50%, SSPE 5X, Denhart 5X, SDS 0.1% y DNA de esperma de salmón 10ug/ml en baño maría a 42°C. Luego de 1h de incubación se agregó 1 millón de c.p.m. de la sonda y se hibridizó a 42°C. La sonda había sido previamente marcada por el método de random primer por incubación del DNA molde con dCTPa32, fragmento Klenow de E. coli y un primer al azar.

Al cabo de 12h en el baño María, la membrana fué sometida a 3 lavados sucesivos a temperatura ambiente por 10min. con SSC 2X y SDS 0.1%, seguidos de un cuarto lavado a 50°C con SSC 1X y SDS 0.1%. Finalmente la membrana fue secada y depositada en papel de filtro Whatman para ser luego envuelta en papel celofán y empacada en cassette para autoradiografía con película Hiperfilm (ambos de Amershan). Luego de 12h a -70°C, la película fué revelada y leída (10,11).

Resultados

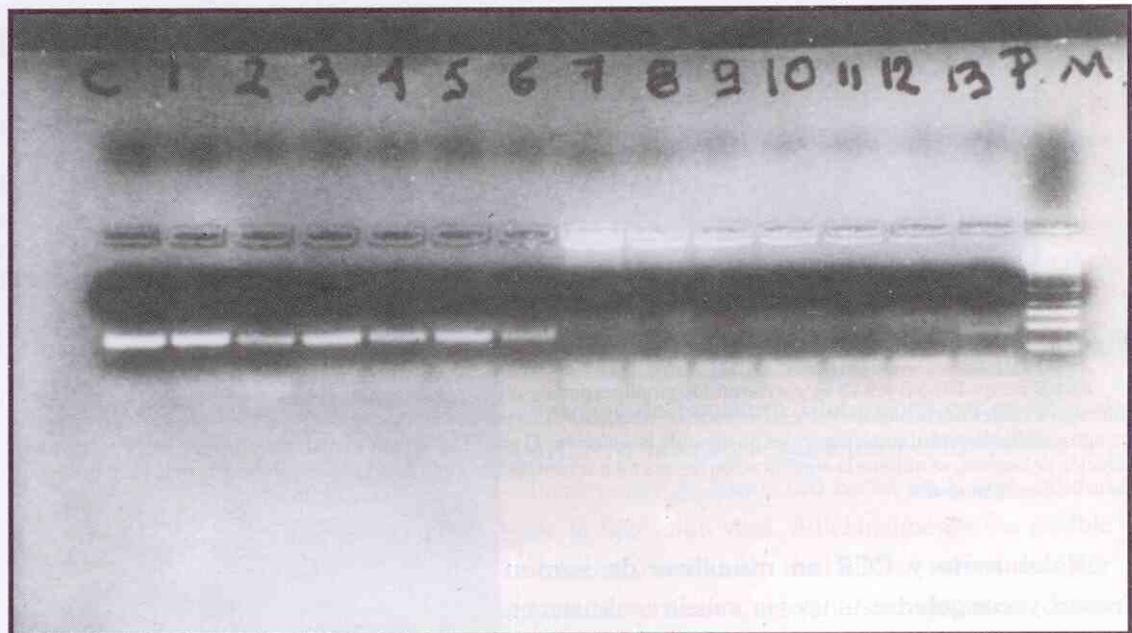
Aislamiento viral a partir de muestras de semen: el título del virus detectado mediante inoculación en células MDBK fué de 10^4 DIC50. Cuando las diluciones del virus se practicaron no en medio de mantenimiento, sino en plasma seminal o en semen total, la toxicidad de ésta muestra sobre las células MDBK, no permitió la detección del virus. Se practicaron entonces diluciones dobles del semen y se encontró que era necesario diluirlo mínimo 1:64 a 1:128 para evitar el efecto tóxico, lo cual está de acuerdo con informes previos (4,14). Valga anotar que además de esta citotoxicidad, la mayoría de muestras de semen

colectadas en condiciones de campo, obviamente no estériles, se encuentran contaminadas con hongos, bacterias o levaduras lo que obstaculiza aún más la visibilidad del ECP e interfiere con los resultados del aislamiento.

Al realizar diluciones 1:100 de cada una de las diferentes muestras de virus diluido en semen, desde 1:10 hasta 1:100.000, el ECP solo pudo detectarse hasta la dilución viral 1:100; por lo tanto, de acuerdo con el título viral obtenido utilizando medio de mantenimiento (104) se pudo concluir que en el semen, la mínima cantidad de virus detectada a través del aislamiento en nuestras condiciones de trabajo era de 100DI. Efectivamente, luego pudo constatar que el virus diluido en semen y el semen a su vez diluido 64-128 veces, para evitar la citotoxicidad de la muestra, solo era detectable hasta la dilución 10^2 .

Resultados de la PCR: el DNA del lote de virus sometido a 5 ciclos de congelación y descongelación sucesiva fué detectado hasta una dilución de 10-5 /10-6 en agua destilada estéril, sin embargo cuando la dilución se realizó en semen total o en plasma seminal el DNA viral no fué detectado (ver figura 1).

Figura 1
Inhibidores de la Taq polimerasa en las muestras de semen



Muestras probadas por PCR y reveladas en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. El pozo 1 contiene el HVB-1 control positivo (DNA) tratado con proteinasa K por 3h/56°C. Los pozos 2-7 son el resultado de las diluciones decimales del DNA viral en agua destilada estéril desde 10^1 hasta 10^6 . Los pozos 8-14 corresponden a diluciones dobles de semen desde 1:5 hasta 1:320, con una dilución constante de DNA viral: 10^1 . El pozo 15 tiene el marcador de peso molecular con bandas que aumentan de 100 en 100 desde 100 hasta 1500. Nótese la banda amplificada en el control positivo y en las diluciones del virus en agua, que corresponde a 173 pb y aparece por debajo de la banda de 200pb del marcador de peso molecular. En las muestras de diluciones dobles de semen experimentalmente contaminado, la banda de interés solo se observa tenuemente en la dilución 1:320.

Los diferentes métodos de extracción de DNA viral empleados, resultaron igualmente exitosos al amplificar las diluciones virales hechas en agua destilada estéril, pero no favorecieron la amplificación a partir de virus diluido en semen, ni en plasma seminal. Ante esta imposibilidad técnica se realizaron diluciones dobles del semen o plasma seminal en agua destilada estéril desde 1:5 hasta 1:320 en principio y luego, desde 1:500 hasta 1:6000, con una cantidad constante del inóculo (virus diluido 1:10 en el volumen final de dilución seminal), para encontrar la dilución de la muestra en la cual se lograra desarrollar la prueba, y posteriormente; se procedió a determinar la máxima dilución viral

detectable, en la dilución del semen que permitiera la amplificación.

La inhibición de la PCR desapareció inicialmente en la dilución 1:320 del semen, pero solo para la dilución viral 1:10 (Ver figura 1). Luego se pudo determinar que la dilución ideal de la muestra de semen para equiparar la amplificación de la máxima dilución viral en agua, correspondiente a 10^{-5} , fué de 1:6000 (Ver figura 2). Sin embargo, cuando se utilizó una doble concentración de la taq polimerasa (2 U/muestra) en la mezcla para la reacción de PCR se pudo superar la inhibición observada en la dilución 1:4000 (resultados no mostrados).

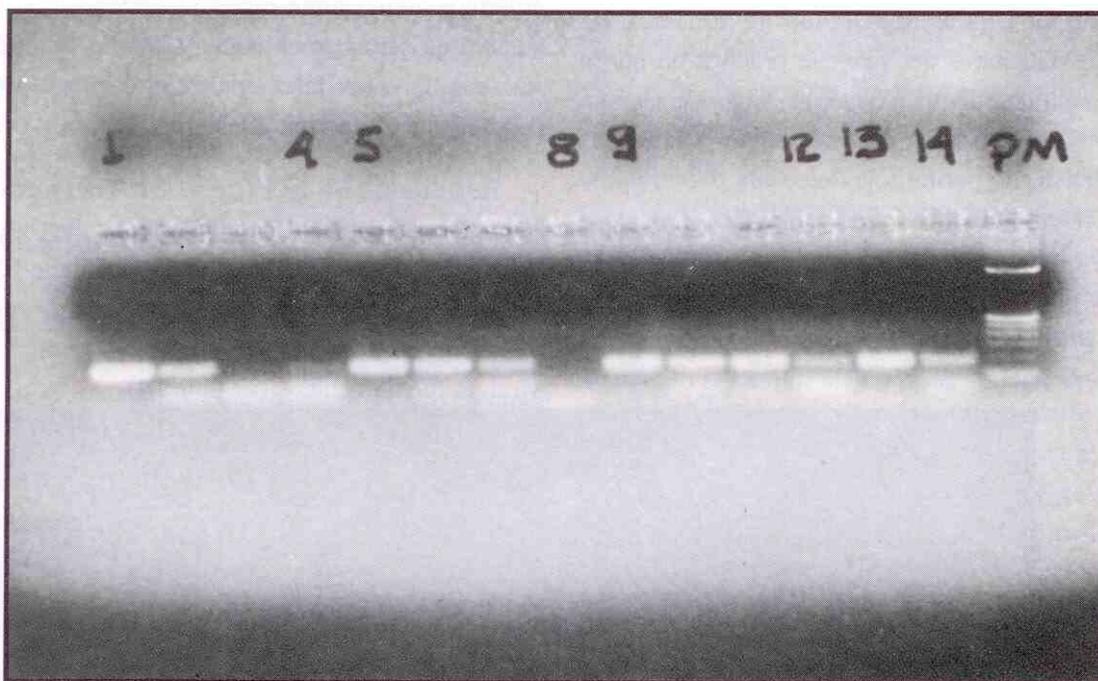


Figura 2. Dilución de las muestras de semen

En los pozos 1-4, 5-8 y 9-12 se corrieron los amplificados de muestras de semen diluidas 1:4000, 1:5000 y 1:6000 respectivamente, con diluciones virales decimales decrecientes desde 10^{-1} hasta 10^{-4} . Los pozos 13 y 14 contienen respectivamente DNA viral diluido 1:10 y 1:10.000 en agua destilada estéril como controles positivos de la reacción. El pozo 15 contiene el marcador de peso molecular. Obsérvese como a mayor dilución del semen, se obtiene la amplificación de una menor cantidad de DNA molde, verificándose de esta forma, la existencia de inhibidores de la PCR en la muestra.

Aislamiento y PCR en muestras de semen fresco y congelado: todas las muestras de semen fresco tomadas de toros seropositivos, y de semen congelado, experimentalmente contaminado con el HVB-1, resultaron positivas por PCR a pesar de haber presentado resultados negativos por la prueba de aislamiento viral (ver figura 3).

Figura 3

Prueba de muestras de campo
(semen fresco y congelado)

Los pozos 1-4 contienen muestras semen tratado con proteinasa K por 6h/56°C, de toros seropositivos para RIB. Los pozos 5,6 y 7 corresponden a muestras de semen de toros seronegativos contaminadas experimentalmente con 1DICC50, congeladas en pajillas por métodos convencionales (3) y posteriormente descongeladas y diluidas 1:400. La muestra del pozo 8 pertenece a una pajilla de semen de un toro seronegativo. Pozos 9,10 y 11 corresponden a las muestras 5,6 y 7 pero diluidas 1:600. El Pozo 8 diluida 1:600. Los pozos 13 y 14 contienen DNA viral (control positivo) y control de reactivos respectivamente y el pozo 15 contiene el marcador de peso molecular. Obsérvese la banda muy tenue en los pozos 1 a 4 y 5 a 7.

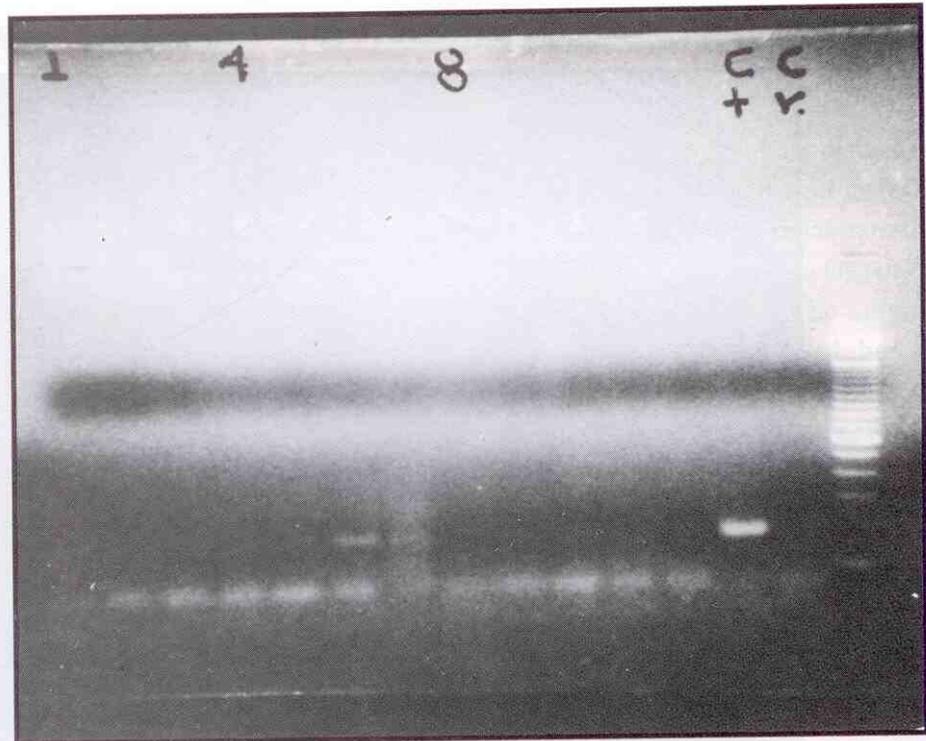
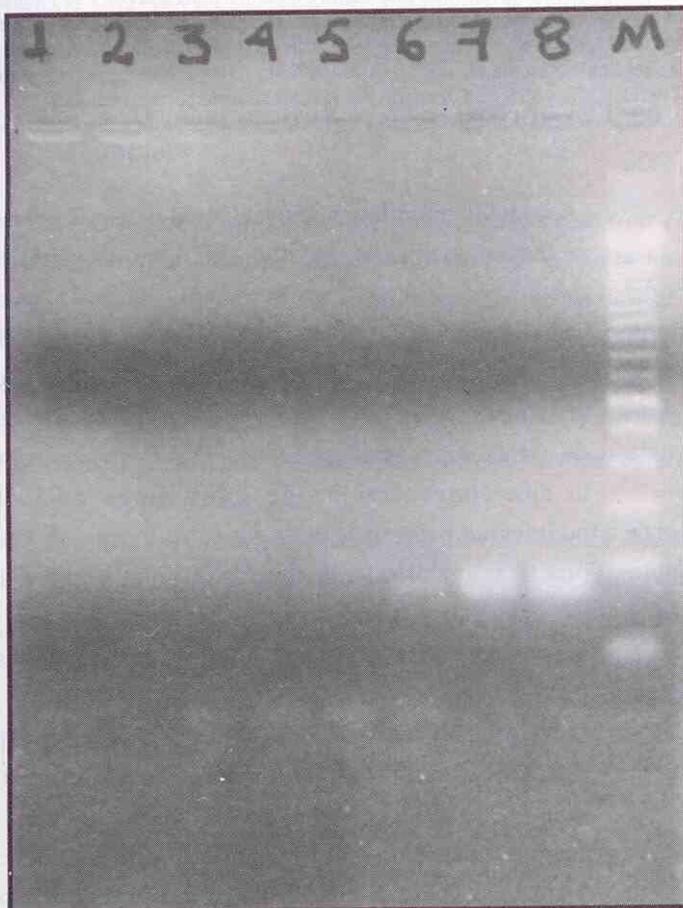


Figura 4 Inhibición de la PCR en el extensor para congelación de semen. Los pozos 1-7 contienen diluciones dobles del extensor seminal (Glicerol, tris, yema) desde 1:10 hasta 1:640 y posteriormente contaminadas con la dilución del DNA viral 10^{-1} . El pozo 8 contiene DNA viral diluido 1:10 como control positivo de la reacción y el pozo 9 contiene el marcador de peso molecular. Se puede ver como se la inhibición de la reacción desaparece en 1:640.



Vale la pena destacar, que también en el diluyente empleado para congelación de semen, parecen existir inhibidores de la PCR, pero algunos ensayos realizados permitieron determinar que dicho efecto se pierde cuando la muestra se diluye alrededor de 400 veces (ver figura 4). Los Herpesvirus humanos empleados como controles no mostraron ninguna amplificación inespecífica (no mostrado).

Southern Blot: finalmente se realizaron 7 ensayos de Southern Blot de los cuales solo el primero mostró resultados positivos con un incremento de hasta 100 veces en la sensibilidad de la detección viral. Adicionalmente fue posible detectar una dilución viral 1:10 en semen sin diluir tratado con chelex, algo antes no logrado mediante la observación del producto del PCR en geles de agarosa. Las pruebas posteriores no permitieron la detección de la señal a pesar de la fiel reproducción de las condiciones de los protocolos previamente establecidos.

Figura 5 Autorradiografía de muestras de DNA del HVB-1 diluido en agua, semen y plasma seminal.



El DNA amplificado por PCR fué transferido a una membrana de nylon, hibridizado con una sonda específica marcada con P32 y sometido a autorradiografía por 12h/-70°C. Los pozos 1-7 contienen diluciones decimales en agua destilada estéril del DNA viral. Los pozos 8 y 9 están ocupados por semen sin diluir contaminado con DNA viral diluido 1:10 y 1:100 respectivamente. Los pozos 10 y 11 contienen las mismas muestras 8 y 9 pero tratadas con chelex. Los pozos 12 y 13 contienen plasma seminal contaminado con DNA viral diluido 1:10 y 1:100 respectivamente. La muestra 14 es la misma que ocupa el pozo 12, pero tratada con chelex y el pozo 15 está ocupado por el marcador de peso molecular.

Se observa señal consistente en todas las diluciones del DNA viral en agua destilada estéril y en las muestras de semen completo tratado con chelex.

Discusión

El aislamiento viral ha sido considerado clásicamente como la prueba de oro para la detección del HVB-1(15) pero la muestra de semen presenta diversos factores particularmente citotóxicos que impiden, en muchas ocasiones, verificar la presencia del agente (4).

Como se pudo constatar, también existe fuerte inhibición de la reacción de PCR debida probablemente a las altas concentraciones de iones de Na,K,Cl y azúcares como la fructosa y la glicerofosforilcolina disueltos en el plasma seminal (3), pero estas dificultades técnicas fueron parcialmente superadas mediante la dilución de la muestra, la alteración de la proporción de Mg, crítica para la enzima, o el incremento en la concentración de la Taq polimerasa (10,13).

Con los métodos de extracción de DNA empleados se pretendía unicamente liberar el genoma viral de las proteínas de la envoltura y la cápside, ya que de acuerdo con informes recientes el HVB-1 se encuentra preferencialmente en forma extracelular (2), por lo cual se piensa que se podrían obviar los extensos procesos de extracción y purificación del DNA total. No obstante la alta concentración de inhibidores de la Taq polimerasa presentes en la muestra, hacen necesario practicar un protocolo de purificación como los ya desarrollados para mejorar la amplificación sin necesidad de llevar a cabo la dilución de la muestra (6).

La sensibilidad de la PCR parece baja según nuestros resultados, pero si la comparamos con la prueba de aislamiento viral, existen varias ventajas que deben ser consideradas: el menor tiempo requerido para obtener resultados, la escasa cantidad de muestra necesaria para

la reacción y la posibilidad de detectar el genoma aunque el virus se encuentre inactivado, o las muestras estén contaminadas con otros microorganismos, o contengan anticuerpos neutralizantes. Esta prueba es a la vez confirmatoria lo que evita procesos adicionales de identificación del agente aislado.

Todas estas razones son suficientes argumentos para mantener el interés en dicha prueba como un método alternativo para la detección del virus en este tipo de muestra.

La dilución empleada para llevar a cabo la PCR en las muestras de semen congelado en pajillas (1:400) (figura 5) aunque parece inferior a la que se debe utilizar para eliminar la inhibición encontrada en el semen fresco (1:4000), es realmente equivalente, ya que cuando el semen fresco va a ser sometido a congelación es diluido o extendido previamente 10 ó más veces para lograr la concentración de espermatozoides exigida en inseminación artificial (25 millones de espermatozoides en 0.5 cc. de diluyente). Es decir que para llevar a cabo la PCR a partir de pajillas de semen sería necesario diluir solo 400 veces para eliminar tanto la inhibición

de los componentes del semen como de los componentes del diluyente seminal (tris, yema, glicerol).

Es de anotar que a pesar de ser una prueba no totalmente estandarizada aún, la PCR aquí descrita, mostró sus posibilidades excepcionales en las muestras de campo probadas, a partir de las cuales no fue posible detectar el virus en cultivos celulares. Lo anterior sugiere la necesidad de continuar la labor de optimización de esta prueba en semen, lo cual facilitaría su uso para otros gérmenes que afectan la reproducción.

Finalmente, una de las mayores preocupaciones de nuestro grupo de trabajo tiene que ver con la posibilidad de recuperar el potencial genético de toros de razas autóctonas en vía de extinción que por estar infectados con el virus de la RIB, están imposibilitados legalmente para participar en programas de inseminación artificial. El verdadero impacto de la vía de transmisión venérea no ha sido definido y hacia esta meta a la vez básica y aplicada esta orientada nuestra intención investigativa utilizando técnicas como la descrita.

Summary

Standardization of a polymerase chain reaction (PCR) technique for the detection of Bovine Herpes Virus-1 (BHV-1) in semen samples BHV-1 can be found in semen from seropositive animals, but the frequency of excretion and the impact of this route for the dissemination of the infection have not been established. In order to improve the sensibility of detection of the virus in semen, we attempted to standardize a PCR.

As previously reported by others investigators we found that semen contains PCR inhibitory factors that makes it necessary to dilute the samples up to 1:6000 or more to obtain DNA amplification. With the purpose of increasing the sensibility of the assay, the amplified PCR product was detected by southern blot with an oligonucleotide probe internal to the amplified fragment.

Preliminary assays showed a 100-fold increase in the sensibility with this strategy.

Despite the high dilution of the semen sample, we could detect the virus in samples collected from bulls from herds with symptoms compatible with Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR).

This PCR could be used in quality control of specimens used in programs of artificial insemination and embryo transfer. In addition, it could be used for the determination of the biological implications of this route of virological excretion.

Referencias

1. FENNER F, BACHMAN P, GIBBS E, et al. *Veterinary Virology* Orlando: Academic Press, 1987. 660p.
2. GUERIN C, HARLAY T, GUERIN B, THIBIER M. Distribution of fractions of semen from a naturally infected bull. *Theriogenology* 1993; 40: 997-1002.
3. HAFEZ E.S.E. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 4a ed. Ed interamericana. México. 1984. 599 p.
4. HOWELL C L, MILLER M J and BRUCKNER D A. Elimination of toxicity and enhanced Cytomegalovirus detection cell cultures inoculated with semen from patients with acquired Immunodeficiency Syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* 1986;657-660.
5. KIBENGE FS, HARRIS LM, McKENNA PK et al. Amplification of strains of bovine herpesvirus 1 by use of polymerase chain reaction with primers in the thymidine kinase region. *Am J Vet Res*. Vol 55 No.9: 1206-1212, 1994
6. LOPAREV VN; CARTAS MA; MONKEN CE et al. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify infectious agents. 1991. *J. Virol. Methods* 34:105-112.
7. SEAN P, METZGER D A and HIGUCHI R. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *Biotechnique* 1991;4:506-513.
8. TIKOO S.K., CAMPOS M. and BABIUK L.A. Bovine Herpesvirus-1: Biology, pathogenesis and control. *Advances in Virus Research*. 1995. Vol 45 p. 191-223.
9. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, TIKOO S, LIANG X, BABIUK L. Bovine herpesvirus-1 vaccines. *Imm. and Cell Biol* 1993; 71: 405-420.
10. VAN ENGELENBURG F, MAES R, VAN OIRSHOF J, RIJSEWIJK F. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine Herpesvirus type 1 in semen bovino. *J Clin Microbiol* 1993; Vol 31 No.12: 3129-3135.
11. VAN ENGELENBURG F A C, VAN SCHIE F W, RIJSEWIJK F A M, et al. Excretion of bovine herpesvirus-1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. *Journal of Clinical Microbiology* 1995;308-312.
12. VAN OIRSCHOT J, STRAVER J, VAN LIESHOUT A, et al. A subclinical infection bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Vet Record* 1993; 132: 32-35.
13. VILCEK S, NETTLETON P F, HERRING J A, et al. Rapid detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) using polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* 1994;42:53-64.
14. WEIBLEN R, KREUTZ L.C, CANABARRO T.F et al. Isolation of herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1992. No. 4: 341-343