

AMPLIFICACION DE ADN IN VITRO (PCR): II. DESARROLLO Y APLICACIONES EN EL AREA VETERINARIA

Hirigoyen, D.*; Bruzzoni Giovanelli, H.*;
Azambuja, C.**; Stoll, M.**(**)

RESUMEN

Los principales avances en los sistemas de detección han llevado a un rápido impacto en la tecnología diagnóstica. Los más usados consisten en sistemas de determinación directos e indirectos, radioactivos o no radioactivos, que tienden a ser más sensibles que los métodos tradicionales.

Desde la corta existencia de la Biología Molecular como ciencia, varios aportes impulsaron la vertiginosa revolución tecnológica a la que hoy asistimos. Ellos incluyen: el uso de las enzimas modificadoras de los ácidos nucleicos "enzimas de restricción" que cortan el ADN en secuencias específicas; técnicas de secuenciamiento de ácidos nucleicos y proteínas; análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de ADN (RFLPs) y finalmente el PCR.

En la primera parte se describió la instrumentación y los fundamentos básicos del PCR, en este trabajo se ejemplifican algunas de las aplicaciones de la técnica en el campo veterinario.

Palabras clave: DIAGNOSTICO VETERINARIO, BIOLOGIA MOLECULAR, MARCADORES GENETICOS, GENES, PCR.

APLICACIONES DIAGNOSTICAS

La capacidad de obtener un aumento en el número de secuencias de ADN en pocas horas, la especificidad, y fidelidad de la enzima que se utiliza, hacen del PCR un instrumento versátil

cuando se aplica en el campo diagnóstico. Así, esta revolución de la técnica lleva a que muchos laboratorios de biología molecular la adopten cada vez en mayor número. Basta con mirar que desde julio de 1990 a junio de 1991 las cifras de comercialización de la división PCR de Cetus fue de 20.9

millones de dólares con un beneficio de 6.3 millones (58). Por otro lado la firma Hoffman-La Roche estableció acuerdos en la compra de esta tecnología por 300.000.000 de dólares por compartir los derechos de los productos médicos que se pondrán en el mercado a fines de 1992 y 1993 (58).

SUMMARY

The principal improvement in the detection systems had carried a rapid change in the diagnostic technology.

The direct, indirect, radioactive and non radioactive systems usually used are more sensitive than traditional methods.

Since the brief existence of Molecular Biology as a science several contributions had lead to the vertiginous technology revolution to what we now assist. They include: "restriction enzymes" that cut the DNA in specific sequences; nucleics and proteins sequencing, Restriction Fragments Large Polimorphism (RFLPs) and recently the PCR.

In the first part the instrumentation and basic fundamentals of PCR were described, and now in this paper the authors purpose is to relate a few technic applications in the veterinarian area.

Key word: VETERINARY DIAGNOSTIC, MOLECULAR BIOLOGY, GENETIC MARKERS, GENE, PCR.

* División Citogenética. Instituto de Investigaciones Biológicas "Clemente Estable" (IIBCE). Avda. Italia 3318

** Unidad de Biotecnología. Estación Experimental "Las Brujas" Inst. Nac. de Investigaciones Agropecuarias, INIA.

El desarrollo de método tiende a la automatización y dado los antecedentes previos en breve el PCR se estará usando en todos los laboratorios clínicos. Posiblemente de futuro en el campo veterinario a nivel de grandes centros de faena se podrán efectuar las detecciones y seguimientos epizootiológicos de diversas enfermedades, con dicha técnica.

Su aplicación a situaciones en las que los agentes etiológicos involucrados son difíciles y lentos de cultivar, como los casos de *Borrelia burgdorferi*, *Mycobacterium sp.*, HIV, etc. hacen a la técnica la metodología más adecuada.

Algunas de las aplicaciones que se citan en la TABLA 2, serán brevemente desarrolladas con el propósito de brindar una idea de los múltiples situaciones en la que la técnica brinda utilidad.

SELECCION ASISTIDA POR MARCADORES

Muchas clases de marcadores genéticos han sido utilizados desde Mendel hasta nuestros días. La evolución de las técnicas de laboratorio en particular las inmunológicas y electroforéticas nos han permitido reconocer caracteres polimórficos que van desde los grupos sanguíneos hasta las variantes proteicas e isoenzimáticas.

A nivel de los ácidos nucleicos también se revelan polimorfismos más frecuentes que los detectados de sus productos génicos (5). Basta sólo tener en cuenta que el genoma eucariótico contiene aproximadamente 10^5 genes codificados generalmente por 3 a 5% del total de los 3×10^9 pb de ADN.

Un marcador de ADN es un fragmento polimórfico que pre-

INVESTIGACION	APLICACION
	Analisis de polimorfismo génico Caracterización de bacterias Tipificación viral Estudios evolutivos Analisis de sitios de integración viral Mejoramiento asistido por marcadores
DIAGNOSTICO	Determinación de diferentes alelos Determinación de sexo en embriones Analisis polimórfico de esperma Fingerprinting Diagnóstico de paternidad y parentesco Determinación de origen y pureza racial Detección de virus latentes Aplicación histopatológica Detección de portadores virales Rastreo de enfermedades exóticas Diagnóstico bacteriano. Diagnóstico parasitario.

senta 2 o más formas alélicas, y que sirve como punto de referencia para alguna región del genoma (61). Esos marcadores genéticos se distribuyen dentro de todo el material genómico ubicándose físicamente en diferentes sitios cromosómicos (31).

Su asignación en el genoma, asociado a tal o cual manifestación fenotípica (resistencia a determinadas enfermedades, rendimiento de carcaza, producción de leche, cantidad de postura, etc.), permite identificar rasgos producidos por muchos genes caracterizados por variables continuas (4), que reciben el nombre de QTL (Quantitative Trait Loci) (30) y que tienen aplicación inmediata en programas de selección. (56)

Con la técnica de PCR es posible revelar estos mojonos genómicos (62), pudiéndose así descubrir la información contenida en determinados fragmentos (2). Muchas veces

desconocemos la real información contenida en las secuencias amplificadas de un individuo (marcador), pero su presencia puede ir ligada a determinada bondad o rasgo de interés productivo.

Un abordaje más fáciles cuando se está en presencia de un gen específico o grupos de genes interrelacionados siendo posible reconocer tal o cual carácter por la existencia de las bandas amplificadas en un gel de agarosa, luego de someterlo a una corrida electroforética. Un ejemplo es la determinación alélica para determinadas proteínas de la leche bovina. Existen variantes alélicas para estas proteínas que le imparten a la leche mejores propiedades tecnológicas en la producción de queso y otros sub-productos lácteos (33)(35). Con el PCR se puede en 1 o 2 días analizar el ADN

extraído de sangre y semen, identificando el genotipo del animal para esas características proteicas en leche(22)(34) luego de una amplificación y digestión con enzimas de restricción (44) (53).

SEXADO DE EMBRIONES

La predeterminación del sexo en las especies domésticas mejora la eficacia de producción reduciendo en un gran impacto económico.

Este tipo de encare se efectúa más extensamente en la especie bovina como resultado de las nuevas técnicas que se derivan o asocian a la transferencia de embriones, y que involucran la bisección, fecundación *in-vitro*, clonaje, transferencia génica y el sexado.

El sexado de embriones mamíferos se efectúa por diversos métodos que se basan en detectar la presencia del cromosoma Y macho específico (39). Entre ellas el Cariotipado presenta un grado de detección muy bajo que va de 30% a 60% en el mejor de los casos. Las técnicas inmunológicas que se basan en el reconocimiento de antígenos HY membranarios no están muy extendidas en bovinos. Por otro lado también se utilizaron sondas marcadas a partir de secuencias repetidas (2500 veces) para realizar hibridización *in situ* sobre *Bos taurus* y *Bos indicus*, pero su desarrollo lleva mucho tiempo y es algo engorroso.

Con el PCR es posible amplificar secuencias repetidas específicas del brazo corto del cromosoma Y (44) con primers que flanquean dichas zonas, permitiendo así efectuar el diagnóstico en embriones.

De esta forma embriones bovinos obtenidos por colectas uterinas de vacas donadoras o por

fertilización *in vitro* pueden ser biopsiados en el estado de blastocito, sexados por PCR, e implantados sin afectar su viabilidad y desarrollo posterior. (42)(52)

El PCR ofrece ventajas frente a los otros métodos de sexado por la rapidez con que se efectúa la técnica (42), y por no tener que manipular radioisótopos.

La especificidad de la técnica en ADN de linfocitos es de 100%, y la sensibilidad permite detectar 10 a 20 pg (picogramos) de ADN correspondiente a aproximadamente 1 o 2 células embrionarias. (39)

ESTUDIOS ANATOMOPATOLOGICOS

La técnica de amplificación ha sido aplicada en una gran variedad de materiales tisulares; estos van desde blastocistos, vellosidad corial, folículos pilosos (21), células de sangre periférica, células espermáticas (18), epiteliales (12), inclusive tejidos provenientes de cuerpos macerados. (17)

La amplitud del método permitió exitosamente amplificar materiales congelados por mucho tiempo, fijados con formol y embebidos en parafina (53) o plástico (16), cuando fueron procesados para la detección de anomalías genéticas y mutaciones oncogénicas.

La posibilidad de trabajar en evaluaciones histopatológicas en el campo veterinario cobra gran importancia en virtud de afinar diagnósticos que no se resuelven convencionalmente; permitiendo efectuar estudios epizootológicos retrospectivos de piezas anatómicas existentes en los archivos patológicos. El ADN de los tejidos se preserva en el tratamiento y montaje recibido por la pieza anatómica para estudios histopatológicos, pudien-

do ser el mismo obtenido y amplificado sin problemas.

ESTUDIO EVOLUTIVOS

La amplificación de ADN *in vitro* se viene utilizando en biosistemática con la obtención de fascinantes análisis de relación filogenética, en toda la escala zoológica, plantas protistas y procariontes.

Los biólogos obtienen rápidamente por esta técnica datos de diferentes secuencias entre las especies. Eligiendo secuencias conservadas entre organismos ampliamente divergentes pueden asignar los rangos filogenéticos por comparación de los análisis, clasificando los organismos por niveles, clases o phylum. (28)(29)

En el estudio de poblaciones varios elementos controvertidos con respecto a los orígenes de algunas especies extintas pueden ser abordados, por la posibilidad que el PCR ofrece sobre materiales del pasado que han sido hallados en investigaciones arqueológicas.

A manera de ejemplo cabe consignar que sobre piezas antiguas se destacan los estudios efectuados sobre ADN mitocondrial de cerebros humanos momificados hace 7000 años (41), y de especies de lobos ya extintos (59).

IDENTIFICACION GENOMICA (FINGERPRINTING)

El polimorfismo genómico existente entre poblaciones y entre individuos de una misma especie puede ser explorado en el campo veterinario para identificar origen, pureza racial, excluir o controlar la filiación de un animal. (15)

Explotando esta variabilidad es posible identificar el origen del semen utilizado en Inseminación

Artificial llegando así a certificarse el donador (25).

Existen regiones altamente polimórficas que reciben el nombre de VNTRs (variable number of tandem repeats) que tienden a concentrarse en las regiones proterminales de los cromosomas (38)(46)(63). La variabilidad individual en el patrón de bandeo obtenido con estas sondas ha demostrado ser de tal magnitud que ellas permiten identificar inequívocamente a un animal o conjunto de animales o bacterias, y diferenciarlo de los demás constituyendo un verdadero "finger-printing".

Esta información contenida en el ADN es heredada como caracteres Mendelianos simples de los progenitores, exhibiendo las mismas variaciones multialélicas en

el número de copias repetidas, y pudiendo ser reconocida en la progenie.

Además de estos "minisatélites" se han descrito otro tipo de secuencias repetidas en tandem más cortas denominadas "microsatélites". Consisten en repeticiones de una sola base (poly-G o poly-A), repeticiones de TC (poly-TC) y CAC (poly-CAC) que están en el orden de $5-10 \times 10^4$ y que se distribuyen en islotes a través del genoma de los mamíferos.

Estos se separan entre sí por secuencias únicas de ADN que tienen longitud variable y que cuando son amplificadas, entre diferentes individuos exhiben un alto polimorfismo en su longitud. Por otro lado su información marcadora puede ser descubierta a través de su secuenciamiento (49).

IDENTIFICACION VIRAL

La aplicación en este campo también abre nuevos horizontes, existiendo reportes de diagnósticos virológicos que se efectúan en policubetas de poliestireno de 96 hoyos. En este tipo de soporte se realizan ensayos de hibridación en sandwich para capturar los productos de amplificación del virus de Inmunodeficiencia humana (HIV tipo 1) (7); así como la determinación de ADN de virus de Hepatitis B (HBV) en suero (27). Estas aplicaciones hacen que el PCR se esté tornando un procedimiento de rutina en laboratorios clínicos humanos, permitiendo monitorizar rápida y eficazmente este tipo de afecciones en forma masiva.

En el campo veterinario su utilización se halla aún inexplica-

Primer y único Levamisol + Closantel

REVANIMIX

Oral e inyectable

LABORATORIO

Revan

Guayaquí 3095 Montevideo

blemente menos extendida; sin embargo en Australia este test complementa métodos tradicionales para el diagnóstico de virus pertenecientes al género Orbivirus, como es el caso del virus de Lengua Azul (BTV) (14).

Fiebre Aftosa, afección extensamente estudiada fruto de implicancias políticas y económicas continúa hoy, en el contexto mundial siendo una de las enfermedades que más inversión ha llevado para investigación y desarrollo del agente, así como en la producción de vacunas, inmunomoduladores y biológicos; tampoco ella ha sido ajena a la introducción de esta herramienta. Se ha podido detectar de varios especímenes clínicos bovinos la amplificación de secuencias de ADN específicas de la cápside viral (23). De esta manera el PCR permite rastrear rápidamente animales portadores, resultando una técnica más sensible que los cultivos celulares (23)(40).

Diagnósticos precoces de infección por virus de Leucosis Bovina (BLV) también han sido desarrollados por este método, presentando ventajas frente a otras técnicas que detectan anticuerpos contra proteínas de envoltura viral gp51 y p24 (6), en razón de que por PCR se pueden determinar formas provirales que no han sido aún indicadas por el sistema inmunocompetente.

Cabe destacar que paulatinamente todos los agentes virales se van incorporando a la nómina de rastreos por PCR, existiendo algunos reportes en Distemper canino, en virus Diarrea viral bovina (BVD), en virus de la familia Rabdovirus como el de la Rabia (60), etc.

BACTERIOLOGIA

En esta área el número de trabajos publicados que utilizan el PCR también va aumentando a medida que

se dispone del conocimiento de secuencias de genes que codifican productos específicos para cada bacteria.

Rápidas y específicas determinaciones con genes bacterianos que codifican para toxinas tipo Vero (Verotoxinas) se han efectuado (26), con tan solo 100 pg de ADN de *E. coli* (43).

En Brucellosis, importante zoonosis que afecta gran variedad de animales domésticos, se desarrolló el test diagnóstico por PCR para diagnosticar todas las bacterias del género *Brucella*.

La sensibilidad de la técnica permite diagnósticos con tan solo 100 fentogramos (10^{-15}) de ADN de *Br. abortus*, lo que equivale a un poder de resolución de aproximadamente 20 bacterias (10).

El desarrollo de la misma resultó ser un instrumento rápido, sensible y específico que complementa las otras pruebas diagnósticas de Brucellosis.

Otro tópico donde realmente cobra importancia la aplicación del PCR es con microorganismos de difícil y lento crecimiento como es el caso de *M. tuberculosis*, el cual necesita de 3 a 6 semanas de cultivo. Esto hace poco expeditiva la confirmación diagnóstica por técnicas convencionales, agravada muchas veces por la poca especificidad y sensibilidad de las técnicas serológicas.

Con PCR se logra una determinación altamente específica de cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (19), a partir de muestras de diversos orígenes, pudiendo llegarse a reconocer un número límite de hasta 100 bacterias en esputo (19).

En un reporte efectuado por otro equipo de investigadores, trabajando con *M. tuberculosis* y *bovis* consiguieron detecciones de

hasta 10 células bacterianas (54).

Con un microorganismo muy emparentado también se lograron obtener sondas altamente específicas para detectar secuencias repetidas de *M. paratuberculosis* (61), agente causal de la enfermedad de Jhone, o Paratuberculosis. Los autores del trabajo lograron en 12 horas arribar al diagnóstico a partir de la amplificación específica del *M. paratuberculosis*, el cual fue distinguido del *M. avium*, que presenta un 98 a 99% de homología en sus bases (61).

Otros encares bacteriológicos con diferentes agentes microbianos vienen siendo resueltos aplicando siempre la polimerización in vitro lo que ha permitido identificar *Borrelia burgdorferi* (32), agente causal de la enfermedad de Lyme, *Leptospira hardjo*, genotipo bovino (64), *Chlamydia psittaci* (20), *tracomati* y *neumoniae* (24), etc..

PARASITOLOGIA

El abordaje de los parásitos en lo que respecta a su diagnóstico y caracterización viene cobrando gran relevancia con este tipo de técnicas lográndose excelentes abordajes fundamentalmente en la producción de antígenos utilizados para rastrearlos, o bien utilizados en la producción de vacunas.

Dentro de los protozoarios del grupo Apicomplexa un representante típico como *Toxoplasma gondii*, es rastreado con la técnica de PCR. Cuando se lo aplica se pueden detectar tan pocos como 10 taquizoitos circulantes, lo cual resulta obviamente en un poderoso instrumento que permite efectuar diagnósticos que escapan a los otros procedimientos serológicos.

Con *Anaplasma* se ha logrado amplificar un fragmento de 200 pb altamente específico de *A. margin-*

nale luego de 35 ciclos, que se utiliza como diagnóstico en la determinación de portadores crónicos (1). En Babesia bigemina sucede algo similar obteniéndose una sensibilidad muy alta en el ensayo, capaz de detectar animales infectados crónicos con afección inaparente.(11)

Con aislamientos de Tripanosoma cruzi provenientes de pacientes humanos, animales e insectos de varios orígenes americanos se lograron al analizar por PCR patrones de bandas diferenciales. La evidencia de este polimorfismo del parásito se basa en amplificar elementos correspondientes a regiones variables de sus minicírculos. El método resulta ser extremadamente rápido y sensible para detectar portadores chagásicos, y su puesta en práctica

permitiría rastrear bancos de sangre, y efectuar estudios epidemiológicos. (3)

CONCLUSIONES

Muchas áreas se ven enormemente beneficiadas con esta metodología al dar respuesta a varios elementos que aún permanecen oscuros en el campo de la biología.

Con el rápido desarrollo tecnológico al que hoy asistimos, es posible automatizar y acelerar el diagnóstico por PCR de muchas afecciones animales de etiología variada.

En los programas de mejoramiento su implementación contribuiría complementando las otras herramientas utilizadas, con el fin de identificar e introducir en

majadas, rebaños, etc. caracteres de interés productivo. La implementación y extensión a nivel de campañas sanitarias permitiría obtener a nivel nacional y regional un gran impulso en los diferentes rubros de explotación.

Cabe destacar que aún quedan varias incógnitas por responder sobre el método; pero a pesar de ello creemos que el avance tecnológico que la adopción de dicha técnica trae aparejado en el campo veterinario hace que se deba reflexionar y comenzar a aplicarla.

BIBLIOGRAFIA

1. Aboytes R. (1990) Anaplasma marginale DNA amplification by Polimerase Chain Reaction as a new diagnostic technique. Pu-

CON 

EN LA SANIDAD ANIMAL

LABORATORIO CIENCIA
"EL DE LAS GRANDES MARCAS"

DERRAMIN
 GARRAPATICIDA INSECTICIDA

LUIS A. DE HERRERA 4009 - TELS.: 20 86 74 - 29 69 11

- blished in Anaplasmosis, Babesiosis. Network pp 3. Anolles, G.C.;
2. Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M. (1991) DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligo-nucleotide primers. *Molec. and Bioch. Parasitol.* 9:553-557
 3. Avila, H.; Goncalves, A. M.; Nehme, N.S.; Morel, C.M. and Simpson L. (1990) Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. *Molec. and Bioch. Parasitol.* 42:175-188
 4. Beckman, J.S. and Soller M. (1987) Molecular markers in the genetic improvement of farm animals. *Biotechnology* 5:573-576
 5. Bolstein, D.; White, R.L.; Skobrick, M. and R.W. Davis (1980) Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J.-Hum. Genet.* 32:314-331.
 6. Brandon, R.B.; Naif, H.; Daniel, R.C.W. and Lavin, M.F. (1991) Early detection of bovine leukosis virus DNA in infected sheep using the polymerase chain reaction. *Res. in Vet. Science.* 50:89
 7. Byrne, B.C.; Li, J.J.; Sninsky, J. and Poesz, B.J. (1988) Detection of HIV-1 RNA sequences by in vitro DNA amplification. *Nucleic Acids. Res.* 9:4165.
 8. Contelle, C.; Williams C.; Hanasyde, A.; Hardy, K.; Wiston, R. and Williamson R. (1989) Genetic analysis of DNA from single human oocytes—a model for preimplantation diagnosis of cystic fibrosis. *Br. Med. J.* 299:22-24.
 9. Chhab, F.F.; Doberty, M.; Cair, KanYw; Cooper, S.; Rubin, E.M. (1987) Detection of Sickle cell anaemia and Thalassemias. *Nature.* 329:293-294.
 10. Fekete, A.; Bantle, J.A.; Halling, S.M. and Sanborn, M.R. (1990) Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *69:216-227.*
 11. Figueroa J.V.; Johnson G.S. and Buening G. M. (1991) Detection of *Babesia bigemina* DNA by PCR amplification. Published in anaplasmosis babesiosis. Network 3:pp5.
 12. Gasparin, P.; Savoia, A.; Pignatti, P.F.; Dalpiccola, B. and Novelli, G. (1989) Amplification of DNA from epithelial cells in urine. *New. Engl. J. Med.* 320:809.
 13. Georges, M. and J. M. Massey. (1991) Velo-genetics, or the synergistic use of marker assisted selection and germline manipulation. *Theor. Genet.* 35:151-159.
 14. Gould, A.R.; Hyatt, A.D.; Eaton, B.T.; White, J.R.; Hoffer, P.T.; Blacksell, S.D. and Smith Le Blanc, P.M. (1989) Current techniques in rapid bluetongue virus diagnosis. *Aust. Vet. J.* 66:450-454.
 15. Grobet, L.; Schwers, A.; Roupain, J., and Hmset, R. (1991) Les empreintes genetiques et autres mar-
quers dans les controles de filiation chez les animaux domestiques. *Ann. Med. Vet.* 135:245-253.
 16. Grunewald, K.; Frichtinger, W.K.; Dietze, O. and Lyons, J. (1990) DNA isolated from plastic embedded tissue is suitable for PCR. *Nucl. Ac. Research* 18:6151.
 17. Hagelberg, E.; Gray, I.C. and Jeffreys, A. J. (1991) Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature.* 352:427-429.
 18. Hanghira Li; Gyllesten, V.B.; Xiang feng, C.; Saiki, R.K.; Erlich, H. A. and Arheim, N. (1988) Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature* 335:414-417.
 19. Hermans, P.W.; Schvitema, A.R.J.; Soolinger, D.V.; Verstynen, C.P.H.J.; Bik, E.M.; Thole, J.E.R.; Kolk, A.H.J. and Van Embden, J.D.A. (1990) Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microb.* 28:1204-1213.
 20. Hewinson, R.G.; Griffiths, P.C.; Rankin, S.E.S.; Dawson, M. and Woodward, M.J. Towards. A differential polymerase chain reaction test for *Chlamydia psittaci*. *Vet. Rec.* 128:381-382.
 21. Higuchi, R.; Von Beroldingen, C.H.; Sensabangh, G.F. and H.A. Erlich (1988) DNA typing from single hairs. *Nature* 332:543.

22. Hirigoyen, D.; Bruzzoni Giovanelli, H.; Azambuja, C. y M. Stoll. Variantes de Kappa-Caseína en leche. Revista: Actualidades y Técnicas Agropecuarias. Abril 1992.
23. Hofner, M.C.; Carpenter, W.C. and Donaldson, A.I. (1990) The identification of Foot and Mouth Disease virus in oesophageal/Pharyngeal fluid and other clinical samples by Taq-Polimerase amplification of reverse transcribed viral RNA. Foot and Mouth Disease Bulletin. 28: ABST. 90/36.
24. Holland, S.M; Gayder, Ch.A. and Quinn, C. T. (1990) Detection and differentiation of Chlamydia trachomatis, Chlamydia psittaci and Chlamydia pneumoniae by DNA amplification. Jour. of Inf. Diseases. 162: 984-987.
25. Hopkins, B.; O'Connell, F.M. and Hopkins, J. (1991) Use of DNA fingerprinting in paternity analysis of closely-related Exmoor ponies. Equine Vet. J. 23:277-279.
26. Johnson, W.M.; Pollard, D.R.; Lior, H.; Tyler, S.D. and Rozee, K.R. (1990) Differentiation of genes coding for Escherichia coli Verotoxin 2 and the verotoxin associated with Porcine edema disease (VTE) by the Polymerase Chain Reaction. J. Clin. Microbiol. 28:2351-2353
27. Keller, G.H.; Huang, D.P.; Shih, J.W.K and Manak, M.M. (1990) Detection of Hepatitis B virus DNA in serum by Polimerase Chain Reaction Amplification and microtiter sandwich hybridization. J. Clin. Microbiol. 28:1411-1416.
28. Kocher, T.D.; Thomas, W.K.; Meyer, A.; Edwards, S.V.; Paabo, S.; Villablanca, F.X. and Wilson, A.C. (1989) Dynamics of mitochondrial evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Natl. Acad. Sci. 86:6196-6200.
29. Kocher, T.D. and White T. J. (1989) Evolutionary analysis via PCR. In H.A. Erlich, ed. PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. Pages 137-147.
30. Lander, E.S. and Bolstein, D. (1989) Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121:185-199.
31. Madean, J.H. (1989) Maps of linkage and synteny homologies between mouse and man. TIG 5:82-86.
32. Malloy, D.C.; Nauman, R.K. and Paxton, H. (1990) Detection of Borrelia burgdorferi using the polymerase chain reaction. J. Clin. Microb. 28:1089-1093.
33. Mariani, P.; Losi, G.; Russo, V.; Castagnetti, G.B.; Grazia, L.; Morini, D. and E. Fossa. (1976) Prove di caseificazione con latte caratterizzato dalle varianti A e B dell K-caseína nella produzione del formaggio Parmigiano-Reggiano. Sci. Tecn. Latt. Cas. 27:208.
34. Medrano J.F. and E.A. Cordova (1990). Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. Bio/technology Vol. 8: 144-146
35. Morini, D.; Lori, G.; Castagnetti, G.B. and P. Mariani. (1979) Prove di caseificazione con latte caratterizzato dalle varianti A e B dell K-caseína: rilievi sul formaggio stagionato. Sci. Tecn. Latt. Cas. 30:243.
36. Mullis, K. B. and F. Falloona (1987) Specifics synthesis of DNA in vitro via polimerasa catalized chain reaction. In "Methods in Enzimology". (R. Wu, Ed.) , Vol. 155. pp 335-350.
37. Nakamura, Y.; Leppert, M.; O'Connell, P.; Wolff, R. Holm, T.; Culver, M.; Martin, C.; Fujimoto, E. ; Hoff, M.; Kumlin, E.; White, R. (1987) Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. Science 235:1616-1622.
38. Nihart, M. (1991) Le transfert embryonnaire et les biotechnologies appliquées: bissection et sexage. Rec. Med. Vet. 167(3/4): 261-290.
39. O. Laor; Yadin, H.; Dalia Chai and Y. Becker (1991) Detection of Foot and Mouth disease virus RNA in diagnostic material using the PCR method on viral genomic Poli-A RNA isolated with oligo dT on magnetic beads. Isr. J. Vet. Med. 46:127-133.
40. Paabo, S.; Gifford, J.A. and A. C. Wilson. (1988) Mitochondrial DNA sequences from a 7000 year old brain. Nucleic Acid. Res. 16:9775-9787.
41. Peura, T.; Hyttinen, J.M.; Turunen, M. and J. Janne. (1991) A reliable sex determination assay for

- bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology* 35:547-555.
42. Pollard, D.R.; Johson, W.M.; Lior, H.; Tyler, S.D. and Rozee K.R. (1990) Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microb.* 28:540-545.
 43. Popescu, C.P.; Cotinot, C.; Boshier, J. et Kirszenbaum, M. (1988) Chromosomal localization of a bovine male specific probe. *Ann. Gent.* 31:39-42.
 44. Roberts, R. (1982) Restricción and Modificación enzimas and their recognition sequence. *Nuc. Acid. Res.* 10:117-144.
 45. Royle, N. J.; Clarkson, R.E.; Wong, Z. and Jeffreys, A.J. (1988) Clustering of hypervariable minisatellite in the proterminal regions of human autosomes. *Genomics* 3:352-360.
 46. Saiki, R. K.; Bugawan, T. L.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A. (1986) Analysis of enzymatically amplified betaglobin and HLA-DQ Alpha DNA with allele specific oligonucleotide probes. *Nature.* 324:163-166.
 47. Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S. et al. (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polimerase. *Science.* 239: 487-491.
 48. Saiki, R.K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich H. A. and N. Arnheim (1985). Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sick cell anaemia. *Science* 230:1350-1354.
 49. Sanger, F.; Nicklen, S. and A.R. Coulion. (1977) DNA secuencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA.* 74:5463-5467.64)
 50. Schroder, A.; Miller, J. R.; Thomsen, P.D.; Roschlau, K.; Avery, B.; Poulsen, P.H.; Schmidt, M.; Schwerrin, M. Sex determination of bovine embryos using the polymerase chain reaction.
 51. Shibata, D.K.; Martin, J.W. and Arnheim, N. (1988) Analisis od DNA sequences in party-year old paraffin thintissue sections: a bridge between molecular biology and clasical histology. *Cancer Res.* 48:4564-4566.
 52. Sjobring, V.; Mecklenburg, M.; Andersen, A.B. and Miorner, H. (1990) Polymerase Chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis. *J. Clin. Microb.* 28:2200-2204.
 53. Smith, H.O. (1970) Nucleotide sequence specificity of restricción endonucleases. *Science.* 205:455-462.
 54. Soller, M. (1990) Genetic mapping of the bovine genome using deoxyribonucleic acid-level merkers to identify loci affecting quantitative traits of economic importance. *J. Dairy Sci.* 73:2628-2646.
 55. Trocheris, I. (1991) Chiron/Cetus: Les adieux de la baleine. *Biofutur* 105:55-57.
 56. Thomas, R.H.; Schaffner, W.; Wilson, A. C. and Paabo, S.. (1989) DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf. *Nature* 340:465-467.
 57. Tordo N.; Bourhy, H.; Sacramento D. (1990) Les Rhahdovirus: classification, structure, mécanismes généraux, épidémiologie moléculaire. *Journée Rhahdovirus. CNEVA, INRA. Ann. Rech. Vet.* 21:310-313.
 58. Trayer, D.L.; Smith, J.E. and Leipold, H.W.. (1990) Implications of genetic markers and maps for veterinary medicine. *JAVMA.* 197:1376-1380.
 59. Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990) Genetic analysis with RAPD markers. *Nucl. Acids. Res.* 18\;6531-6535.
 60. Wong, A.; Wilson, V.; Jeffreys, A.J.; Thein, S.L. (1986) Cloning a selected fragment from a human DNA "fingerprint": Isolation of an extremely polymorphic minisatellite. *Nucl. Ac. Res.* 14:4505-4616.
 61. Woodward, M.J.; Sullivan, G.J.; Palmer, N.M.A.; Woolley, J.C. and Readstone, J.S. (1991) Development of a PCR test specific for *Leptospira hardjo* genotype bovin. *Vet. Rec.* 128: 282-283.

Trabajo aprobado para su publicación 20.07.92.