

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, Decana de América)

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria



“Evidencia Serológica de la Presencia del Virus Herpes Canino
en la Provincia de Lima”

Tesis para optar el título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO

GÓNGORA AYBAR, VLADIMIR EBNER

Bachiller en Medicina Veterinaria

LIMA – PERÚ

2005

CONTENIDO

| | Pág. |
|--|------|
| CONTENIDO | ii |
| LISTA DE CUADROS | iv |
| LISTA DE FIGURAS | v |
| RESUMEN | vi |
| SUMMARY | vii |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | .3 |
| 1. Historia del virus | 3 |
| 2. Características virales | 4 |
| 3. Epidemiología | 6 |
| 4. Transmisión y patogenia | 7 |
| 5. Signos clínicos y lesiones | 10 |
| 6. Respuesta inmune | 12 |
| 7. Diagnóstico | 13 |
| 8. Tratamiento | 14 |
| 9. Prevención | 15 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 16 |
| 1. Lugar de estudio | 16 |
| 2. Animales | 16 |
| 3. Tamaño muestral | 16 |
| 4. Materiales | 17 |
| Material de laboratorio | 17 |
| Reactivos y material empleado en la serología | 17 |
| Material empleado en la toma de muestra y su procedimiento | 18 |

| | | |
|-------|----------------------------|----|
| 5. | Procedimiento de la prueba | 19 |
| 6. | Análisis de datos | 20 |
| IV. | RESULTADOS | 21 |
| V. | DISCUSIÓN | 27 |
| VI. | CONCLUSIONES | 31 |
| VII. | RECOMENDACIONES | 32 |
| VII. | BIBLIOGRAFÍA | 33 |
| VIII. | ANEXOS | 38 |

LISTA DE CUADROS

| | Pág. |
|--|------|
| Cuadro N° 1: Lista de animales utilizados en el muestreo. | 24 |
| Cuadro N° 2: Lista de animales positivos y negativos a la prueba (IFI) según su procedencia y antecedentes. | 25 |
| Cuadro N° 3: Lista animales positivos a la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta contra el virus herpes canino tipo -1. | 26 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| Foto N°1: Control positivo del kit de Inmunofluorescencia indirecta (VRMD) para el VHC-1. | 23 |
| Foto N° 2: Muestra positiva de uno de los perros empleados en el estudio. | 23 |

RESUMEN

El Virus Herpes Canino tipo 1 (VHC-1) es responsable de la enfermedad hemorrágica canina en cachorros menores de cuatro semanas de vida y de algunos problemas reproductivos en perras adultas. En el Perú la enfermedad no ha sido reportada, aunque existen hallazgos que sugieren su presencia. El objetivo del presente estudio fue demostrar la presencia de anticuerpos contra el VHC-1, en la población canina de la provincia de Lima con antecedentes asociados a problemas reproductivos. Para ello se recolectaron muestras de suero de 28 animales procedentes de 7 distritos de la provincia de Lima que tuvieron algún antecedente relacionado a problemas reproductivos y/o mortalidad neonatal para someterlos a la prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI). De los 28 animales muestreados, 9 (32 ± 17 %) resultaron positivos a la prueba, de estos, 5/9 (56%) fueron machos y 4/9 (44%) hembras. De acuerdo al distrito, 5/7 (71%) de los distritos muestreados tenían algún animal positivo y las edades de los mismos fluctuaban entre 8 meses y 10 años.

Palabras clave: Serología, caninos, fallas reproductivas, IFI, Lima.

SUMMARY

The canine Herpesvirus type 1 (CHV-1) is responsible for the canine hemorrhagic disease in puppies aged less than four weeks and for any reproductive problems in adult bitches. In Peru, this disease has been not reported, although there is findings suggesting its presence. Thus, the aim of this study was to show the presence of antibodies against CHV-1 among the canine population associated with antecedents to reproductive problems in the province of Lima. Blood serum samples coming from 28 animals belonging to 7 districts of the province of Lima were collected. These samples that have been related to any reproductive problems antecedent and/or neonatal mortality were submitted to the indirect immunofluorescens test (IFAT). From the total samples, 9 of them ($32 \pm 17\%$) turned out to be positive to the test, besides 5/9 (56%) were male and 4/9 (44%) were female. According to the district, 5/7 (71%) of them had some positive animal which were aged 8 months to 10 years.

Key words: Serology, canines, reproductive failures, IFAT, Lima.

I. INTRODUCCIÓN

Más de las tres cuartas partes de muertes en cachorros, ocurren antes del primer mes de vida y la gran mayoría se produce durante la primera semana, debido a condiciones fisiológicas, congénitas, infecciosas y medio ambientales, además del comportamiento materno (Carmichael, 1999). Desafortunadamente hay una escasa información de las causas verdaderas de la mayoría de enfermedades o muertes perinatales, habiéndose realizando pocas investigaciones sobre este importante aspecto. Se cree que las enfermedades infecciosas constituyen solamente una pequeña fracción de las muertes de cachorros hasta el periodo de destete, sin embargo, se conocen dos enfermedades virales que afectan severamente al cachorro durante las 2 a 5 semanas de vida: la Parvovirus canina y la Enfermedad Hemorrágica Canina (EHC), producida esta última por el Virus Herpes Canino tipo 1.

El Virus Herpes Canino tipo 1, perteneciente a la Familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae* y género *Varicellovirus*, fue identificado por primera vez en 1965. Desde entonces ha sido considerado como el responsable de la Enfermedad Hemorrágica Canina, causante de algunos problemas en el tracto reproductivo y el sistema respiratorio de los cánidos (Ronsse y col, 2003). Esta enfermedad fue reportada inicialmente en Estados Unidos de Norteamérica, existiendo muchos informes que le otorgan presencia mundial. Existen numerosos trabajos publicados en países de Europa y Asia; sin embargo en Latinoamérica son escasos los estudios, sólo en Chile y

Argentina los veterinarios dedicados a pequeños animales han reportado la enfermedad desde hace tiempo (Navarro y col., 2003; Corrada y col., 2002).

En nuestro país la presencia de la EHC no ha sido notificada, sólo se tiene referencia de un caso ocurrido en 1998 cuando en la necropsia de unos cachorros se encontraron lesiones sugerentes de dicha enfermedad (Sandoval y Díaz, comunicación personal) y otro ocurrido recientemente en el examen histopatológico de unos cachorros muertos, con signos de enfermedad respiratoria aguda, en el que además se hallaron corpúsculos de inclusión intranucleares, característicos de la enfermedad (Sandoval, comunicación personal). Sin embargo, teniendo en cuenta la escasa manifestación de signos clínicos de la enfermedad y dado que en el Perú no es práctica rutinaria la necropsia de animales muertos por causas desconocidas, es probable que muchos casos hayan pasado desapercibidos. Por este motivo, el objetivo del presente estudio fue demostrar la presencia de anticuerpos contra el VHC-1 en la población canina de la provincia de Lima, con antecedentes asociados a problemas reproductivos, para que así sea considerado en el diagnóstico diferencial en los casos de muerte neonatal y problemas reproductivos en caninos y se tomen las medidas apropiadas de prevención y control.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Historia del virus

El Virus Herpes Canino tipo 1 (VHC-1) fue identificado y caracterizado en 1965 por tres diferentes grupos de científicos, como un agente infeccioso de los cachorros. Al año siguiente fue aislado de un perro adulto enfermo en Japón asociándose a la tos de las perreras, linfoma maligno y mortalidad neonatal (Carmichael y col., 1965; Stewart y col., 1965; Spertzel y col., 1965; Karpas y col., 1968; Kakuk y col., 1969; Motohashi y Tajima, 1966; citados por Ronsse y col., 2003).

Durante los años 1969 y 1970 se iniciaron los estudios para conocer su verdadera capacidad patogénica, realizándose la primera infección experimental en perros libres de patógenos de 5 a 12 semanas de edad. También se hizo el primer trabajo para conocer el ADN del herpesvirus canino comparando su densidad con la de otros 3 herpesvirus. En esta misma época se realizó el primer aislamiento viral en el tracto reproductivo femenino, siendo asociado con problemas reproductivos (Appel y col., 1969; Poste y King, 1971; Plummer y col., 1970, citados por Ronsse y col., 2003).

Las investigaciones para determinar la presencia de anticuerpos contra VHC-1 en la población canina se iniciaron en 1969 con un trabajo realizado en Estados Unidos donde se encontró un 12% de seroprevalencia (Lundgren y Clapper, 1969; citado por Ronsse y col., 2003). Durante los siguientes años se efectuaron varios trabajos similares en

Estados Unidos, Alemania, Países Bajos, Francia, Suiza, etc., hallándose seroprevalencias variables. Los aislamientos virales también se hicieron más frecuentes en otros continentes durante la década de los setenta (Durham y Poole, 1979; citado por Ronsse y col., 2003).

El primer estudio realizado para desarrollar una vacuna contra VHC-1 fue publicado en 1978, pero no fue sino hasta la década del noventa que se contó con una vacuna experimental, a virus inactivado, desarrollada a partir de la cepa viral F205 que produce pequeñas placas. (Carmichael y Medic, 1978; Carmichael y Greene, 1998). La vacuna desarrollada fue probada exitosamente en el 2001. Seis perras libres de VHC-1 fueron vacunadas contra el virus, diez días después de la monta. A los tres días del parto los cachorros fueron expuestos al virus, a diferencia de los cachorros del grupo control, todos los cachorros de las perras vacunadas sobrevivieron (Poulet y col., 2001).

Después del primer trabajo realizado por Plummer y colaboradores sobre el ADN del herpesvirus canino, se efectuaron pocos trabajos al respecto durante los años siguientes. Sólo un trabajo acerca de las características del ADN del VHC-1 fue publicado en 1974 (Lust y Carmichael, 1974; citado por Ronsse y col., 2003). Veinte años después, al observar la escasa capacidad patogénica del VHC-1 en perros adultos, se pensó en utilizarlo como un candidato ideal para desarrollar vacunas recombinantes contra otras enfermedades caninas; por esta razón se realizaron estudios más profundos para conocer el genoma del VHC-1 (Limbach y col., 1994). Luego de varios estudios se obtuvieron los primeros virus recombinantes, expresando glicoproteínas del virus de la rabia, pseudorrabia y del parásito protozoario *Neospora Caninum* (Xuan y col., 1998; Nishikawa y col., 1999; Nishikawa y col., 2000).

2.- Características virales

Como todos los virus pertenecientes a la familia *Herpesviridae*, El VHC-1 posee envoltura y una nucleocápside icosaédrica de aproximadamente 150 hexámeros y 12 pentámeros. Debido a la naturaleza de la envoltura, el virión es algo pleomórfico con un diámetro de 115 a 175 nm. y una masa molecular de 63×10^6 Daltons. Dentro de la nucleocápside se encuentran el ADN genómico, compuesto de una molécula de ADN

lineal de doble cadena con un tamaño de 128 Kpb (Kilopares de bases) y un contenido de guanina-citosina de 33% (Ronsse y col., 2003; Carmichael, 1999; Remond y col., 1996)

Alrededor de la cápside existe una capa de material globular conocida como tegumento que está rodeada a su vez por la envoltura externa donde se localizan los pleplómeros de naturaleza glicoproteica (Fenner y col, 1992). El virión del herpesvirus contiene 30 proteínas estructurales de las cuales 6 están en la nucleocápside y 2 se encuentran asociadas al ADN. En la envoltura externa se encuentran las proteínas necesarias para la adsorción y penetración del virus en la célula hospedadora (gB, gC, gD, gE, gF,) (Tarradas y col., 2002).

El ADN del VHC-1 está formado por 2 componentes unidos covalentemente denominados Largo (UL) y Corto (US) que componen el 82 y 18% respectivamente, ambos componentes presentan secuencias invertidas que permiten la inversión de las no repetidas, de modo que se obtienen cuatro isómeros durante la replicación (Vadillo y col, 2002; Haanes y Tomlinson, 1998; Fenner y col, 1992).

El virus es sensible a los solventes de los lípidos (cloroformo, éter, etc.) y desinfectantes comunes (cloramina, formaldehído, derivados fenoles, amonio cuaternario, etc.). También es inestable a $\text{pH} < 5.0$ y > 8.0 y es inactivado a temperaturas mayores a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y menores de $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Carmichael, 1999 y Ronsse y col., 2003). La multiplicación viral es óptima entre los 35 y $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, su poder de infección comienza a disminuir luego de 24 horas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y después de 5 días a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Carmichael, 1999).

El efecto citopatogénico (ECP) está caracterizado por hinchazón, redondeo y finalmente separación de las células en cultivo. Varias inclusiones acidófilas o basofílicas intranucleares pueden ser observadas y son menos numerosas que en otros herpesvirus. La formación de sincitios celulares es rara. Actualmente sólo un tipo serológico ha sido identificado, aunque fueron observadas varias diferencias en los ECP (Carmichael y Greene, 1998).

Hasta el momento el VHC-1 sólo ha sido aislado en especies pertenecientes a los cánidos, sin embargo, un estudio menciona la detección de anticuerpos en las nutrias de río (*Londra canadensis*) en América del Norte (Kimber y col., 2000; citado por Ronsse y col., 2003). Filogenéticamente el VHC-1 parece ser más cercano al herpesvirus felino tipo1 y al herpesvirus de la foca tipo1 (Harder y col., 1998).

La replicación del VHC-1 es similar a la de otros herpesvirus (Carmichael, 1999; Ronsse y col., 2003). La síntesis del ADN viral y de la nucleocápside ocurre dentro del núcleo de la célula huésped y la envoltura viral se adquiere en la membrana nuclear. El virus se transporta a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi hasta la superficie celular donde se libera; sin embargo la mayor parte de los viriones permanecen dentro de la célula ya que igual que otros herpesvirus, el VHC-1 tiene la capacidad de permanecer latente dentro de la célula durante toda la vida (Carmichael y Greene, 1998).

3.-Epidemiología

El VHC-1 ha sido aislado en los cinco continentes (Ronsse y col., 2003; Navarro y col., 2003). Los estudios seroepidemiológicos más recientes, realizados en Europa, Asia y Norteamérica muestran seroprevalencias mayormente altas, siendo la del Reino Unido la más alta con 88 % (Reading y Field, 1998) y la de Francia la más baja con 31 % (Guigal y col., 2002, citado por Ronsse y col., 2003).

Los factores que afectan la etapa serológica de un individuo han sido poco documentados. Diferentes investigadores han observado una relación creciente entre la edad del animal y la seroconversión. Se sugiere que la edad de la madurez sexual (1 a 2 años) y la primera monta (2 a 3 años) son momentos de seroconversión importantes. Se ha observado seroprevalencias crecientes hasta la edad de 5 a 6 años (Lacheretz y Cornnard, 1998; Seo y col., 1994, citados por Carmichael y Greene, 1998).

El virus ha sido aislado de animales afectados con tos de la perrera. Sin embargo, el rol de esta enfermedad en la epidemiología de VHC-1 no es conocido. La latencia de

VHC-1 ha sido demostrada por muchos autores (Miyoshi y col., 1999; Burr y col., 1996) y por tanto se considera una infección de por vida (Ronsse y col., 2003).

Lo mencionado y las reactivaciones esporádicas, con liberación de virus en animales estresados y/o debilitados podrían tener importancia en la presencia de seroprevalencias elevadas. Los portadores latentes suelen ser asintomáticos, manteniendo la circulación del virus y siendo fuente de infección para los individuos susceptibles, como las hembras gestantes y los neonatos (Carmichael y Greene, 1998).

Después de la primera infección (vía oronasal o genital) o después de una reactivación, el virus se libera luego de 3 a 5 días durante un período máximo de 2 a 3 semanas (Ronsse y col., 2003; Okuda y col., 1993). Una reactivación inducida después de una inoculación oronasal puede conducir a una excreción genital (Okuda y col., 1993). De la misma manera una infección genital puede conducir a una excreción oronasal y conjuntival (Hill y Maré 1974, citado por Ronsse y col., 2003).

4.-Transmisión y patogenia

Los cachorros recién nacidos pueden adquirir la infección por VHC-1 *in utero*, al pasar por el canal del parto, por contactos con compañeros de camada infectados, a través de secreciones oronasales de la perra o rara vez por fomites. Los cachorros menores de una semana de edad, infectados en forma experimental, son particularmente susceptibles a infecciones generalizadas mortales, los mayores de dos semanas son relativamente resistentes y suelen desarrollar una enfermedad clínica leve o inaparente. La replicación del virus en perros de mayor edad se restringe a las vías genitales, tonsilas, ganglios linfáticos retrofaríngeos, bronquiales y en ocasiones los pulmones (Carmichael, 1999). El virus puede alojarse en tonsilas o en la glándula salival parótida (Burr y col., 1996).

El virus puede transmitirse a través del útero durante la gestación. Las perras preñadas infectadas durante la gestación media o tardía, pueden abortar cachorros débiles o muertos sin signos en la madre. Los fetos infectados durante la gestación tardía pueden aparecer normales al parto y otros alojan el virus en forma inaparente en

sus tejidos, sin embargo, la mayor parte de los cachorros desarrolla la infección sistémica en el transcurso de 9 días luego de nacer (Hashimoto y col., 1983; citado por Carmichael y Greene., 1998).

En los cachorros recién nacidos la infección primaria produce la replicación viral en las células epiteliales y mucosas en el transcurso de 24 horas de la inoculación. A continuación, el virus penetra al torrente sanguíneo por medio de macrófagos. La viremia intracelular origina diseminación viral en la totalidad del cuerpo en el transcurso de tres a cuatro días post infección (Carmichael, 1999).

La localización de las células fagocíticas mononucleares de los ganglios linfáticos y del bazo da lugar a la diseminación entre células produciendo hiperplasia linfoide y necrosis. Ocurre necrosis hemorrágica multifocal progresiva en varios órganos; las concentraciones más altas del virus se encuentran en glándulas suprarrenales, riñones, pulmones, bazo e hígado. La hemorragia multifocal que acompaña a las lesiones necróticas tal vez se relacionan con la trombocitopenia notable que ocurre durante la infección, que quizá resulte de coagulación intravascular diseminada relacionada con el daño endotelial vascular y la necrosis tisular diseminadas (Carmichael y Greene, 1998).

Una lesión frecuente en cachorros infectados orofaríngeamente es la ganglioneuritis del nervio trigémino. El herpesvirus canino puede viajar por los axones neurales hasta el SNC, como ocurre con el Virus Herpes Simple del humano. Es común que ocurra meningoencefalitis en cachorros neonatales infectados por vía oronasal, pero no siempre son obvios los signos del SNC. En circunstancias normales los cachorros suelen morir de enfermedad sistémica antes de que se muestren signos neurológicos (Ronsse y col., 2003).

En el desarrollo súbito de resistencia a la infección que ocurre en la primera y segunda semanas de vida participan varios factores, que incluyen la regulación de la temperatura corporal y el estado inmunitario. Se ha demostrado que el crecimiento óptimo del VHC-1 en cultivos celulares ocurre entre 35 °C y 37 °C. La temperatura rectal normal de perros adultos (38.5 °C a 39.5 °C) es mayor al límite crítico. En el cachorro recién nacido no se desarrolla la regulación de su temperatura hasta las 2 ó 3

semanas de edad y la temperatura rectal suele ser 1 °C a 1.5 °C menor a la de un perro adulto. Además de tener una capacidad reducida para regular la temperatura, los cachorros neonatales son incapaces de producir adecuadamente fiebre (Carmichael y Greene, 1998).

A temperaturas menores de 39 °C también se suprimen las funciones inmunitarias de mediación celular y eso hace a los cachorros hipotérmicos más susceptibles. Normalmente los cachorros de 4 a 8 semanas de edad son asintomáticos clínicamente después de la infección sistémica por VHC-1, pero desarrollan una infección sistémica si se reducen de manera artificial sus temperaturas corporales. Por el contrario, el aumento de la temperatura ambiental y en consecuencia la de los cachorros menores a una semana de edad infectados con VHC-1, reduce la gravedad de la infección (Carmichael y Greene, 1998).

En perros adultos se ha aislado ocasionalmente herpesvirus de lesiones papulovesiculares del aparato genital descritas como posibles episodios recurrentes en perras infectadas previamente. El VHC-1 puede causar infecciones genitales o respiratorias, con eliminación del virus, en presencia de anticuerpos circulantes. Al parecer, la infección del aparato genital suele ser asintomática o limitarse a hiperemia vaginal con folículos linfoides hiperplásicos (Carmichael, 1999).

Es posible que la localización genital del virus en perros adultos sea un medio de transmisión venérea del virus, pero es la más importante como fuente de infección en cachorros al nacer. La diseminación de VHC-1 de machos seropositivos a perras susceptibles durante el apareamiento no parece una forma importante de transmisión, aunque se piensa que este mecanismo ocurre (Ronsse y col., 2003; Carmichael, 1999).

Usando la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se ha demostrado la persistencia del virus en ganglio lumbosacro con supuesta reactivación, replicación mucosa y eliminación subsecuente (Miyoshi y col., 1999). Las pruebas de campo sugieren que VHC-1 podría ser un agente involucrado en afecciones respiratorias, pero los estudios no han podido reconocerla como primaria. Aunque de importancia incierta, se ha recuperado VHC-1 de los pulmones de perros con moquillo y pacientes con

conjuntivitis aguda. Los recién nacidos que se recuperan de infecciones por herpesvirus canino y los perros mayores que tienen infecciones subclínicas presentan episodios periódicos de recrudescencia viral en sus secreciones oronasales (Carmichael, 1999).

Se ha demostrado latencia viral en perros infectados por vía intranasal hasta por seis meses post infección, con reactivación en el transcurso de unas semanas después del tratamiento con glucocorticoides o suero antilinfocitario. También se ha demostrado reactivaciones de virus latentes en adultos seropositivos después de exponerse a juveniles seronegativos, lo que sugiere mecanismo de estrés para la transmisión de VHC-1 (Okuda y col, 1993).

En la mayor parte de las perras que recibieron dosis inmunosupresoras altas repetidas de glucocorticoides, se reactivaron infecciones latentes con eliminación sintomática de virus por las secreciones nasales, orales y vaginales (Miyoshi y col., 1999; Burr y col., 1996). La reactivación viral es una explicación factible de la persistencia subclínica y las reactivaciones raras de abortos, infecciones fetales o enfermedades neonatales; también sirve como una vía de transmisión a perras susceptibles, en especial cuando se cría en una perrera (Carmichael y Greene, 1998).

5.-Signos clínicos y lesiones

No se han observado signos premonitorios de enfermedad ni antecedentes de mortalidad neonatal en perras que pierden camadas de cachorros por CHV-1. Las infecciones transplacentarias pueden ocurrir en la mitad o ultimo tercio de gestación y dar por resultado abortos de fetos momificados o muertos, cachorros prematuros o recién nacidos débiles o con desmedro. Al parecer es menos común la muerte de cachorros neonatales menores de una semana y tal vez indica infección *in utero*. Entre los cachorros que nacen vivos dentro de una camada, es posible que algunos no estén infectados y que varíe la edad de gestación en que ocurrió la enfermedad entre los afectados (Carmichael, 1999).

Cuando la infección por VHC-1 en cachorros se da después del nacimiento, va acompañada de una enfermedad mortal aguda que ocurre principalmente entre la

primera y la tercera semana de edad. Si se afectan cuando tienen más de tres semanas, desarrollan una infección por herpesvirus diseminada, que se piensa se exacerba por una infección o inmunosupresión concurrente. Los cachorros infectados parecen embotados y deprimidos; pierden interés en la lactancia, disminuyen de peso y eliminan heces blandas de color verde amarillo, lloran con persistencia y muestran molestia durante la palpación del abdomen (Carmichael y Greene, 1998).

A pesar de la actividad muscular intensa relacionada con el llanto, la inquietud y el escalofrío, no aumenta la temperatura corporal. La rinitis suele manifestarse por exudados nasales serosos a mucopurulentos, rara vez hemorrágicos. Hay hemorragias petequiales diseminadas en las mucosas. En ocasiones se observa un exantema eritematoso que consiste en pápulas y edema subcutáneo en las regiones abdominal ventral e inguinal. A veces hay vesículas en la vulva y vagina de las hembras, en el prepucio de los machos y en la cavidad bucal (Carmichael, 1999).

Los cachorros pierden el conocimiento y pueden tener opistónonos y convulsiones justo antes de morir. Las temperaturas rectales son subnormales antes de la muerte, que suele ocurrir entre las 24 y 48 horas después de iniciada la enfermedad clínica (Carmichael y Greene, 1998). Algunos tienen una enfermedad clínica leve con recuperación subsecuente. Es probable que los que sobreviven a la infección sistémica tengan signos neurológicos persistentes. Son más comunes ataxia, ceguera y déficit vestibulares cerebelares (Carmichael, 1999).

Los perros mayores de tres a seis semanas desarrollan una afección respiratoria superior leve o no aparente como resultado de la infección. En cachorros de más edad son raros los signos de infección sistémica; sin embargo, se han publicado informes sobre emesis, anorexia, depresión, exudado ocular seroso, hepatomegalia y muerte súbita en cachorros de coyote de 8 a 10 semanas de edad infectados de manera natural (Carmichael y Greene, 1998).

Las infecciones genitales primarias en perras de mayor edad se caracterizan por lesiones linfocelulares, grados variables de hiperemia vaginal y en ocasiones hemorragias submucosas petequiales o equimóticas. En las perras preñadas afectadas no

se observan molestias ni exudado vaginal incluso en las que tienen abortos u óbitos. Se han observado lesiones vesiculares durante el inicio del proestro que regresan en el transcurso del anestro, aunque no se ha encontrado relación del ciclo estrual con el título de anticuerpos. Los machos con lesiones similares en la base del pene y el reflejo prepucial pueden tener exudado por el prepucio (Ronsse y col., 2004; Ronsse y col., 2003).

6.- Respuesta inmune

El conocimiento detallado del mecanismo de respuesta inmune frente a VHC-1 es aún incompleto. Sin embargo, se han identificado a las glicoproteínas gp 145/112, gp 47, gp 80 como las responsables de inducir anticuerpos neutralizantes frente al VHC-1 (Xuan y col., 1992). Usando al virus Vaccinia como virus recombinante, se ha podido conocer que los genes que codifican las glicoproteínas homólogas gB, gC y gD son los mismos que codifican a las glicoproteínas gp 145/112, gp 80, gp 47 respectivamente (Xuan y col., 1997). Además se sabe que las glicoproteínas gp 145/112 inducen en primera instancia la formación de anticuerpos neutralizantes y que estos responden de manera cruzada contra las glicoproteínas gp 143/ 108 del virus Herpes Felino tipo 1 (Harder y col., 1998; Xuan y col., 1997; Limcumpao y col., 1990).

Los anticuerpos neutralizantes se pueden detectar dentro de las dos o tres semanas post infección, persistiendo por varios años. Esporádicamente y en forma repetida se produce eliminación del virus, principalmente en las secreciones nasales. Se ha detectado la eliminación viral poco tiempo después de la introducción de perros nuevos en un criadero (“estrés por amenaza”) y se mencionó anteriormente el tratamiento con drogas inmunosupresoras por varios días que producen episodios de reactivación, con eliminación del virus alrededor de la primera semana. En estos casos también hay aumento de los anticuerpos neutralizantes. Esta eliminación viral intermitente asegura el mantenimiento del VHC-1 en la población canina y en los criaderos (Carmichael y Greene, 1998).

Al parecer, en la supervivencia de cachorros infectados, es importante la inmunidad adquirida de la madre. Los que se amantan de perras seronegativas, al infectarse con

VHC-1 desarrollan la enfermedad hemorrágica (Carmichael, 1999). En contraste, los amamantados por perras seropositivas, se infectan pero permanecen asintomáticos lográndose aislar el virus principalmente de la región orofaríngea. Los anticuerpos maternos o los linfocitos inmunes adquiridos a través de la leche explicarían porque, con raras excepciones, las perras infectadas de manera natural que tienen cachorros enfermos posteriormente dan a luz camadas normales. Los títulos séricos de anticuerpos en perras preñadas infectas previamente también pueden suprimir la viremia y la diseminación de la infección al feto (Ronsse y col., 2003).

8.- Diagnóstico

- a) Clínico:** la determinación de la infección en cachorros recién nacidos generalmente se basa en la información obtenida en la anamnesis, el examen físico y las lesiones características encontradas en los cachorros afectados, las alteraciones hematológicas y bioquímicas no son específicas pero es posible observar trombocitopenia notable, también puede notarse un incremento notable de la alaninoaminotransferasa (ALT) (Morgan y col, 2003).

- b) Aislamiento viral:** se puede aislar VHC-1 de varios órganos parenquimatosos de cachorros que mueren de una infección sistémica aguda, pero más comúnmente de las glándulas suprarrenales, riñones, pulmones, bazo, ganglios linfáticos e hígado. En animales recuperados o de mayor edad, el crecimiento de VHC-1 suele restringirse a la mucosa oral, las vías respiratorias superiores y los genitales externos. No se ha demostrado el aislamiento viral desde dos o tres semanas de la inoculación (Carmichael y Greene, 1998). Se han utilizado técnicas de inmunofluorescencia directa, microscopia electrónica y PCR para detectar VHC-1 en tejidos y cultivos celulares (Ronsse y col, 2003; Carmichael, 1999; Burr y col, 1996).

- c) Serología:** varios test de seroneutralización (SN), inmunoflorecencia indirecta, inhibición de la hemaglutinación y ELISA han sido desarrollados para detectar los anticuerpos anti VHC-1. La SN y el test de ELISA han sido los más usados. La SN se caracteriza por su gran especificidad, mientras que la prueba de ELISA es

conocida por su gran sensibilidad, simplicidad en el procedimiento y su automatización (Ronsse y col, 2003). Al agregar complemento obtenido de suero de cuy se ha podido mejorar la sensibilidad de la prueba de SN (Ronsse y col, 2003; Reading y Field, 1999). Sin embargo los nuevos test de SN, sin complemento de cuy, parecen tener una sensibilidad equivalente (Ronsse y col, 2003).

d) Datos histopatológicos: a la necropsia se suele encontrar efusión plural y peritoneal que puede estar sanguinolenta. Hay hemorragias petequiales y equimóticas dispersas en el tejido subseroso, las cuales generalmente constituyen la característica macroscópica más notoria de la enfermedad. Es frecuente observar hemorragias más grandes en el riñón. Los pulmones están edematosos y los bronquios y bronquiolos están llenos de un fluido espumoso. Los ganglios linfáticos están agrandados y enrojecidos, con esplenomegalia (Carmichael y Greene, 1998).

7.- Tratamiento

Debido al curso rápido de la enfermedad hemorrágica en los cachorros, el tratamiento de soporte, fluidoterapia y antibioterapia, suele ser ineficaz (Morgan y col., 2003; Merck, 2000). Sin embargo se puede disminuir la mortalidad al aplicar 1 a 2 ml de suero inmune, de hembras recientemente afectadas por la infección, a cada cachorro. Sólo se requiere de una inyección debido al corto periodo de susceptibilidad frente a la enfermedad clínica (Carmichael y Greene, 1998). También se ha probado algunas drogas antivirales como 5-yodo-2desoxiuridina, pero sólo la vidaravina ha surtido efecto. Aunque el tratamiento pueda evitar la muerte, es posible que ocurra un daño residual en el SNC y miocardio. Es necesario entonces discutir con el propietario esta posibilidad antes de impartir tratamiento (Carmichael, 1999).

El aumento de la temperatura corporal de manera artificial tampoco resulta, si es que ya se manifestaron los signos clínicos, pero ayudaría a disminuir la mortalidad de la camada si se aplica lo más pronto posible (Morgan y col., 2003; Carmichael y Greene, 1998). Recientemente un experimento utilizando cultivos celulares de la línea Madin-Darvy canine Kindey (MDK), demostró la eficiente actividad antiviral de la lactoferrina bovina frente al VHC-1, inhibiendo su multiplicación (Tanaka y col., 2003).

8.- Prevención

La baja frecuencia de brotes clínicos y la escasa inmunogenicidad de las vacunas contra los herpesvirus observada en otras especies, disminuyen el incentivo para producir vacunas comerciales para el VHC-1 (Ronsse y col., 2003). Aun así, se ha producido una vacuna a virus inactivado, elaborada a partir de las glicoproteínas de la cepa mutante fría F205 que produce pequeñas placas y se ha probado su eficacia en perras gestantes, con resultados favorables. Actualmente se produce y comercializa en Francia (Ronsse y col., 2003; Carmichael, 1999).

El esquema de vacunación consiste en una primera dosis durante el celo, o bien 7 a 10 días después de la fecha de monta, para luego aplicar la segunda dosis una a dos semanas antes de la fecha probable de parto. Repitiéndose el esquema para cada gestación.

También se afirma que la administración de un inductor de interferón (Poxvirus aviar) a perras antes de la monta y parto, así como a los cachorros nacidos en perreras con problemas de EHC, induce protección inespecífica contra la infección mortal (Carmichael y Greene, 1998).

El suero inmune se puede aplicar a los cachorros expuestos durante los primeros días de vida como medida preventiva. Además, es necesario mantener una temperatura ambiental adecuada, para garantizar que los cachorros estén bien abrigados. Para ello se puede emplear cajas de parto calentadas, lámparas de calor u otros dispositivos de calentamiento que no causen deshidratación excesiva. El contacto de animales adultos con signos clínicos como balanopostitis, vaginitis, rinitis leve, que pueden ser fuente de infección, debe evitarse con los cachorros recién nacidos (Ronsse y col., 2003).

En cuanto al uso o no de reproductores infectados, es un tema controversial, algunos autores señalan que no es necesario en la mayoría de los casos pero se podría aplicar la restricción a perras y perreras libres de infección. En el caso de perras infectadas es conveniente advertir a los propietarios el riesgo que existe de tener problemas en partos futuros (Ronsse y col., 2003; Carmichael y Greene, 1998).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Lugar de estudio

Las muestras fueron obtenidas de los distritos de San Juan de Lurigancho, San Juan de Miraflores, Santiago de Surco, San Borja, Lurín, Cieneguilla y La Molina, pertenecientes a la provincia de Lima, entre los meses de noviembre del 2004 y abril del 2005.

2.- Animales

Se muestrearon 28 animales, de ambos sexos, de diferentes edades y razas, que tuvieron algún antecedente relacionado con problemas reproductivos, considerando dentro de estos abortos, mortalidad neonatal, infertilidad y reabsorción embrionaria. También se consideraron machos que fueron cruzados con hembras con alguno de los antecedentes mencionados. Finalmente animales provenientes de madres que tuvieron algún episodio abortivo, sobrevivieron a camadas con alta mortalidad, murieron con signos respiratorios o en forma súbita durante las primeras semanas de vida.

3.- Tamaño muestral

El tamaño muestral fue obtenido mediante la fórmula de prevalencia límite (Ahlbon y Norell, 1990).

$$n = \frac{\log (1- \text{confianza})}{\log (1 - p)}$$

n = Tamaño muestral.

p = Prevalencia límite.

Confianza = 95 %.

Se utilizó una prevalencia límite de 10% debido a que no existen trabajos previos en nuestro país, ni en países vecinos que nos proporcionen datos numéricos del estado actual de la enfermedad en nuestro medio. Por lo tanto se han tenido en cuenta las prevalencias de países asiáticos (Corea 28 %, Japón 26 %), europeos (Francia 31 %, Inglaterra 88 %) y de Estados Unidos (6 %), que son los que han realizado encuestas serológicas del Herpes Canino tipo 1 (Ronsse y col., 2003).

4. Materiales

4.1. Material de laboratorio

- Microscopio de fluorescencia.
- Estufa con temperatura de 37 °C.
- Cámara húmeda.
- Balanza de precisión.
- Micropipetas.
- Pipetas.
- Tips.
- Centrifuga de 3000 rpm.

4.2 Reactivos y material empleado en la serología

a) Buffer de dilución: 1% Albúmina Sérica Bovina (BSA) pH 7.2

| | |
|--|----------------|
| - Na ₂ HPO ₄ | 1.19gm |
| - NaH ₂ PO ₄ | 0.22gm |
| - NaCl..... | 8.55gm |
| - BSA..... | 10.0gm |
| - H ₂ O DI/BI*..... | q.s.p.1 litro. |

* Agua desionizada bidestilada.

b) Buffer de lavado con pH: 9.0.

- Na₂CO₃..... 11.4 gm.
- Na HCO₃.....33.6 gm.
- NaCl.....8.5 gm.
- H₂O DI/BI*q.s.p.1.0 litro.

Esta es una solución 4X. Para utilizarla se diluyó en una proporción 1: 4 con agua DI/BI.

c) Fluido de montaje

- Glicerol.
- Buffer de lavado, pH 9.0.

En iguales proporciones ambos compuestos.

d) Suero control positivo anti-VHC-1 (Veterinary Medical Research and Development-VMRD, Inc., Pullman, WA-USA).

e) Inmunoglobulina anti IgG canina conjugada con el fluorocromo Isotiocianato de fluoresceína (ITCF) denominada conjugado (VMRD, Inc., Pullman, WA-USA).

f) Láminas portaobjetos cada una con 10 celdas conteniendo cultivos celulares infectados con VHC-1 (VMRD, Inc., Pullman, WA-USA).

4.3. Material empleado en la toma de muestra y su procedimiento.

- Tubos Vacutainers de 10ml.
- Agujas Venoject N° 21 x 1 ½.
- Holders.
- Algodón hidrófilo.
- Alcohol de 70 °.
- Viales de 2ml.

Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción de la vena cefálica, colectadas en los tubos Vacutainers e identificadas apropiadamente. Colectada la muestra, el tubo fue mantenido verticalmente y luego en plano inclinado, por una hora aproximadamente, luego de la cual se procedió a centrifugarla durante 5 minutos a 3000rpm. El suero obtenido fue separado y almacenado a -20 °C hasta su procesamiento en la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

5.-Procedimiento de la prueba IFI

1. Las placas fueron expuestas a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de retirarle el empaque protector.
2. Se realizó la dilución de 1 en 50 de los sueros problema y del control positivo, utilizando un buffer de dilución con pH 7.2.
3. En cada uno de los pocillos se colocaron 25 µl, en uno de ellos se colocó buffer dilutor como control negativo, en otro, suero diluido como control positivo y en los pocillos restantes se colocaron los sueros problema, para luego incubarlos en cámara húmeda por 30 minutos a 37 °C.
4. Luego de escurrir la placa se utilizó el buffer de lavado (pH 9.0) para enjuagarla y posteriormente dejarla remojar durante 10 minutos en el mismo buffer.
5. Después de escurrir y secar la placa, se colocó 25 µl de suero anti IgG conjugado con ITCF y se dejó incubar, en cámara húmeda, por 30 minutos a 37 °C.
6. Se lavó la placa como en el paso 4 y se procedió a colocarle el líquido de montaje, para finalmente observarla al microscopio de fluorescencia a 1500X.
7. La reacción fue considerada positiva cuando se observó una fluorescencia similar a la del control positivo (Foto N° 1) y negativa cuando no se observó dicha fluorescencia.

6.- Análisis de datos

Los datos y los resultados de los animales muestreados fueron colocados en cuadros, considerando las variables: edad, sexo, raza, procedencia y resultado a la prueba (IFI). Además se obtuvo la edad media y la desviación estándar respectiva. Finalmente, los resultados positivos y negativos fueron expresados en porcentaje y se aplicó la fórmula de intervalo de confianza al porcentaje de positivos, con una confianza del 95 %.

6.1.-Intervalo de Confianza

El intervalo de confianza (IC) fue calculado mediante el empleo de la siguiente fórmula (Daniel, 1996).

$$IC = p \pm z \frac{\sqrt{p(1-p)}}{n}$$

IC = Intervalo de confianza.

Z = Nivel de confianza al 95 % (1.96).

p = Proporción de positivos.

q = 1 – proporción de positivos.

N = Número de animales muestreados.

IV. RESULTADOS

El estudio se realizó con 11 (39.3 %) animales cruzados y 17 (60.7 %) de diferentes razas, con mayor frecuencia de Poodles y Labradores (Cuadro N° 1). Los animales muestreados tuvieron un rango de edades desde un mes hasta diez años de edad.

Todos los individuos del estudio provinieron de siete distritos de la provincia de Lima, perteneciendo la mayor parte a los distritos de Santiago de Surco (7), San Juan de Miraflores (7), San Juan de Lurigancho (5) y los restantes a los distritos de Cieneguilla, Lurín, La Molina y San Borja (Cuadro N° 2).

De las 15 hembras muestreadas, cinco tuvieron antecedentes de alta mortalidad en sus camadas, cuatro abortaron, una presentó reabsorción embrionaria, una presentó ambos episodios, otra presentó infertilidad y la última fue cría de una hembra que abortó un feto a mitad de la gestación (Cuadro N° 1 y 2).

De los 13 machos utilizados en el muestreo, cinco presentaron antecedentes de apareamiento con hembras cuyas camadas presentaron alta mortalidad y abortos; otros cinco sobrevivieron a camadas con alta mortalidad y cinco fueron cachorros con signos de enfermedad respiratoria, muriendo posteriormente (Cuadro N° 1 y 2).

De los 28 sueros procesados 9 (32 ± 17 %) presentaron inmunofluorescencia positiva al Herpes Canino tipo 1 (Cuadro N° 2). La fluorescencia observada fue similar a la del control positivo del kit empleado (Foto N° 1). Los 9 perros positivos al VHC-1 eran de diferente edad, sexo y procedencia. En relación con la edad, hubo animales de ocho meses (2), dos años (2), diez años (2), tres años (1), cinco años (1) y nueve años (1). En cuanto a la procedencia de los perros positivos, 2 residían en el distrito de Lurín, 2 en Cieneguilla, 2 en San Borja, 1 en San Juan de Lurigancho, 1 en San Juan de Miraflores y 1 en La Molina (Cuadro N° 3).

Adicionalmente, del total de animales positivos 3 (33.3%) machos fueron cruzados con hembras que tuvieron abortos o que perdieron sus crías durante las cuatro primeras semanas de vida, 2 (22.2%) fueron hembras con alta mortalidad en sus camadas durante el primer mes, 2 fueron sobrevivientes de camadas con alta mortalidad, 1 (11.1%) fue una hembra con un episodio de aborto y reabsorción embrionaria y 1 sólo abortó. De acuerdo a la raza, fueron 5 animales cruzados, 2 Labradores, 1 Dogo Argentino y 1 Rottweiler.

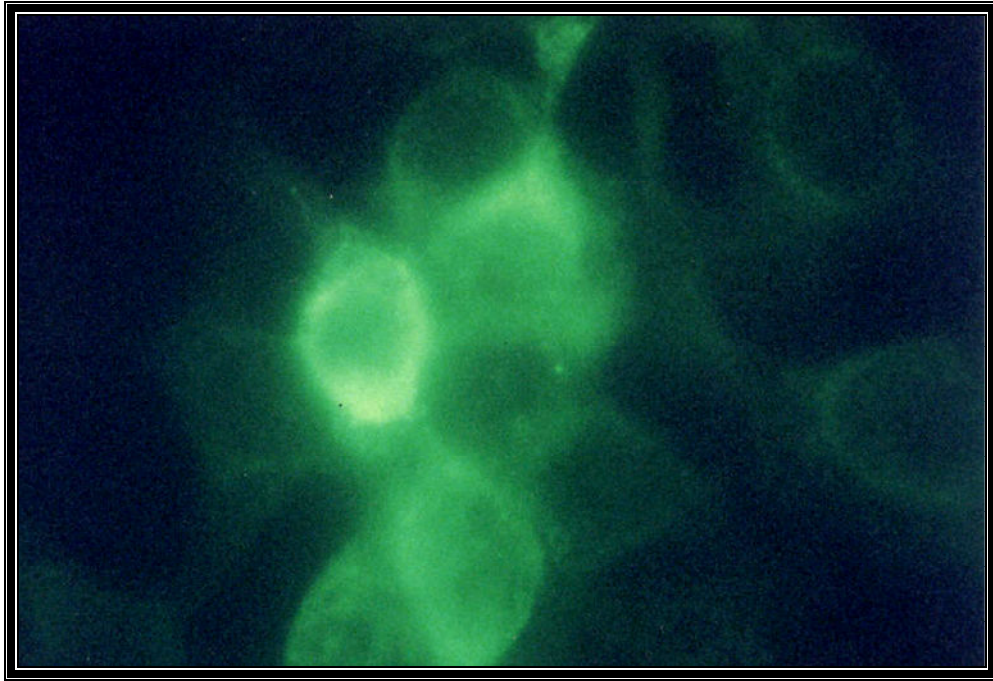


Foto N°1: Control positivo del kit de Inmunofluorescencia indirecta (VRMD) para VHC-1.

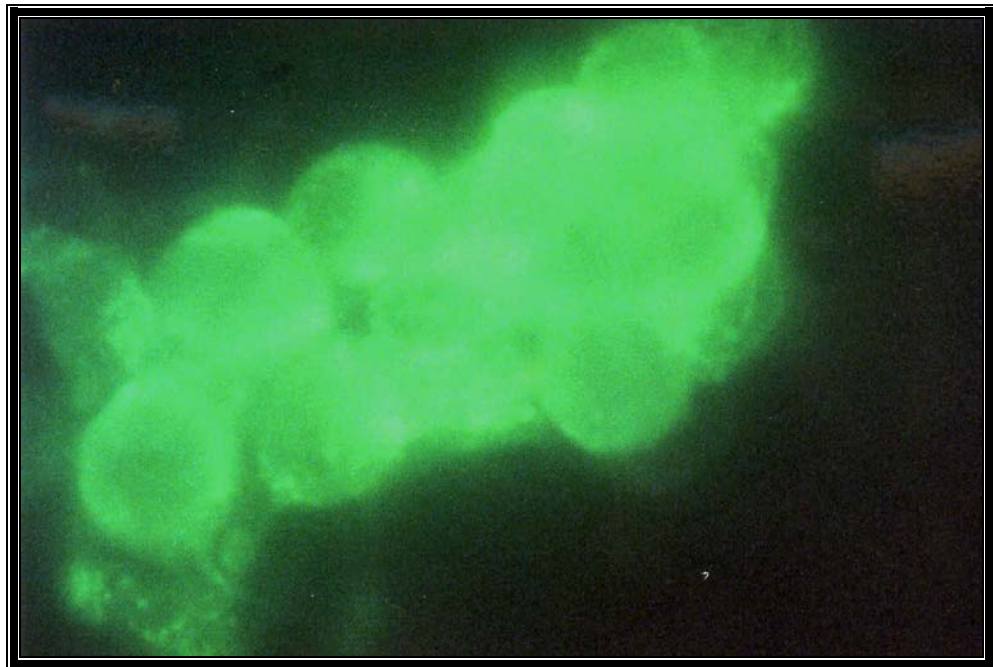


Foto N° 2: Muestra positiva de uno de los perros empleados en el estudio. Nótese una intensa fluorescencia

Cuadro N° 1: Lista de animales utilizados en el muestreo.

| Nº | EDAD | SEXO | RAZA |
|-----------|-------------|-------------|------------------|
| 1 | 2 años | Hembra | Beagle |
| 2 | 10 años | Hembra | Rottweiler |
| 3 | 10 años | Hembra | Labrador |
| 4 | 5 años | Hembra | Labrador |
| 5 | 2 años | Macho | Cruzado |
| 6 | 3 años | Macho | Cruzado |
| 7 | 3 años | Macho | Chow chow |
| 8 | 9 años | Macho | Cruzado |
| 9 | 2 años | Hembra | Dogo argentino |
| 10 | 8 meses | Macho | Cruzado |
| 11 | 2 años | Macho | Cruzado |
| 12 | 2 años | Hembra | Cruzado |
| 13 | 5 años | Hembra | Cruzado |
| 14 | 4 años | Hembra | Cocker |
| 15 | 8 meses | Macho | Cruzado |
| 16 | 1 año | Hembra | Poodle |
| 17 | 9 años | Macho | Poodle |
| 18 | 4 años | Hembra | Poodle |
| 19 | 3 años | Macho | Pastor alemán |
| 20 | 3 años | Macho | Cocker |
| 21 | 4 años | Macho | Cruzado |
| 22 | 3 años | Hembra | Cruzado |
| 23 | 4 años | Hembra | Cocker |
| 24 | 3 años | Macho | Labrador |
| 25 | 4 meses | Hembra | Schnauzer |
| 26 | 2 meses | Hembra | Cruzado |
| 27 | 1 mes | Macho | Chihuahua |
| 28 | 3 meses | Hembra | Golden retriever |

**Cuadro N° 2: Lista de animales positivos y negativos a la prueba (IFI)
según su procedencia y antecedentes.**

| N° | PROCEDENCIA | ANTECEDENTES | RESULTADOS | |
|----|------------------|--|------------|---|
| | | | | |
| 1 | Cieneguilla | Reabsorción embrionaria. | | - |
| 2 | Cieneguilla | Aborto + reabsorción embrionaria. | + | |
| 3 | Cieneguilla | Mortalidad neonatal de crías. | + | |
| 4 | Lurin | Mortalidad neonatal de crías. | + | |
| 5 | Lurin | Cruce, mortalidad de crías. | + | |
| 6 | La Molina | Cruce con hembra que abortó. | + | |
| 7 | La Molina | Abortó. | | - |
| 8 | San Borja | Cruce con hembra que abortó. | + | |
| 9 | San Borja | Abortó, negativo a <i>Brucella sp.</i> | + | |
| 10 | S.J. Lurigancho | Sobrev. de mortalidad neonatal. | + | |
| 11 | S.J. Lurigancho | Sobrev. de mortalidad neonatal. | | - |
| 12 | S.J. Lurigancho | Infertilidad. | | - |
| 13 | S.J. Lurigancho | Mortalidad neonatal de crías. | | - |
| 14 | S.J. Lurigancho | Mortalidad neonatal de crías. | | - |
| 15 | S. J. Miraflores | Sobrev. de mortalidad neonatal. | + | |
| 16 | S. J. Miraflores | Cria de perra que abortó. | | - |
| 17 | S. J. Miraflores | Cruce con hembra que aborto. | | - |
| 18 | S. J. Miraflores | Abortó. | | - |
| 19 | S. J. Miraflores | Sobrev. de mortalidad neonatal. | | - |
| 20 | S. J. Miraflores | Muerto por enfermedad respiratoria. | | - |
| 21 | S. J. Miraflores | Sobrev. de mortalidad neonatal. | | - |
| 22 | S. de Surco | Abortó. | | - |
| 23 | S. de Surco | Mortalidad neonatal de crías. | | - |
| 24 | S. de Surco | Cruce con hembra que abortó. | | - |
| 25 | S. de Surco | Muerto por enfermedad respiratoria. | | - |
| 26 | S. de Surco | Muerto por enfermedad respiratoria. | | - |
| 27 | S. de Surco | Muerto por enfermedad respiratoria. | | - |
| 28 | S. de Surco | Muerto por enfermedad respiratoria. | | - |

TOTAL: 28 (100%) 9 (32%) 19 (68%)

Cuadro N° 3: Lista animales positivos a la prueba de inmunofluorescencia indirecta contra el virus herpes canino tipo-1.

| ANTECEDENTES | EDAD | SEXO | RAZA | PROCEDENCIA |
|--|-------------|-------------|----------------|--------------------|
| Aborto + reabsorción embrionaria | 10 A | Hembra | Rottweiler | Cieneguilla |
| Mortalidad neonatal, crías. | 10 A | Hembra | Labrador | Cieneguilla |
| Mortalidad neonatal, crías. | 5 A | Hembra | Labrador | Lurín |
| Cruce, mortalidad de crías. | 2 A | Macho | Cruzado | Lurín |
| Cruce con hembra que abortó | 3 A | Macho | Cruzado | La Molina |
| Cruce con hembra que abortó. | 9 A | Macho | Cruzado | San Borja |
| Abortó, negativo a <i>Brucella sp.</i> | 2 A | Hembra | Dogo argentino | San Borja |
| Sobreviviente mortalidad neonatal. | 8 M | Macho | Cruzado | S. J. Lurigancho |
| Sobreviviente mortalidad neonatal | 8M | Macho | Cruzado | S. J. Miraflores |

V. DISCUSIÓN

Los problemas reproductivos y la mortalidad perinatal pueden ser ocasionados por causas infecciosas y no infecciosas, dentro de las causas infecciosas se tiene agentes virales (Herpesvirus, Coronavirus, Parvovirus, Adenovirus), bacterianos (*Brucella canis*, *Mycoplasma sp*, *E coli*, *Streptococcus sp*, *Ureoplasma sp*, *Campilobacter sp*, *Leptospira sp*) y parasitarios (*Toxoplasma*, *Neospora*, *Toxocara canis* y *Ancylostoma caninum*) por ello resulta difícil hacer un diagnóstico diferencial sin contar con la ayuda de pruebas auxiliares de laboratorio. Para descartar infecciones por Herpesvirus existen una serie de pruebas tales como las inmunohistoquímicas, serológicas, observación directa por microscopía electrónica y aislamiento viral.

A pesar de que el Virus Herpes Canino tipo-1 (VHC-1) es considerado de distribución mundial (Carmichael y Greene, 1998) no existen estudios previos sobre su presencia en nuestro país. En este primer trabajo se ha encontrado animales positivos a la presencia de anticuerpos contra VHC-1, utilizando la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI). De los 28 sueros procesados, 9 ($32 \pm 17 \%$) resultaron positivos, habiéndose demostrado por lo tanto que los animales han estado expuestos al virus.

El uso de la inmunofluorescencia indirecta (IFI), usando al VHC-1 como antígeno, ha permitido demostrar la existencia de anticuerpos específicos contra el virus en el suero de los animales muestreados. Los animales positivos procedían de diferentes

distritos, sugiriendo así que el virus se encuentra en varios distritos de la provincia de Lima.

Pese a que todos los animales muestreados en este estudio tenían algún historial asociado a problemas reproductivos, sólo el 32 ± 17 % resultó positivo a la prueba de IFI, lo que lleva a pensar que en la etiología de estos problemas estarían implicados otros agentes, además del VHC-1. No obstante, la fórmula empleada para calcular el tamaño muestral permite concluir que al menos el 10% de la población canina con problemas reproductivos tiene anticuerpos contra VHC-1 y podría decirse que el virus investigado tiene una presencia relativamente importante, pudiendo ser responsable de alguno de los casos mencionados en el presente estudio. Por tanto a partir del presente trabajo se debería considerar al VHC-1 en el diagnóstico diferencial de problemas reproductivos en caninos asociados a mortalidad neonatal, abortos y reabsorción embrionaria principalmente.

En los perros adultos se ha aislado ocasionalmente VHC-1 de lesiones papulovesiculares en el aparato genital, aunque estas pueden limitarse a una hiperemia vaginal, pasando por tanto desapercibidas para el propietario (Morgan y col., 2003; Carmichael, 1999). En el presente trabajo se evaluaron 2 perros cuyos antecedentes indicaron el contacto sexual con hembras que abortaron previamente y uno que fue cruzado con una perra que perdió varias de sus crías antes de cumplir el primer mes de vida, los tres animales reaccionaron positivamente a la prueba de herpesvirus canino. Este resultado sugiere que la probable fuente de infección en estos animales sea el contacto sexual con perras que pasaban por un episodio recurrente de una infección latente.

Cuando se produce un cuadro de enfermedad hemorrágica canina en una camada, puede ocurrir que no todos los miembros de la misma desarrollen la enfermedad con igual severidad y por tanto algunos logren sobrevivir (Ronsse y col., 2003). En este estudio 2 cachorros, de madres distintas y sobrevivientes de camadas con alta mortalidad, resultaron positivos a la prueba IFI. En un caso, 11 de 12 cachorros y en otro 6 de 8 murieron antes de cumplir el primer mes de vida. Según los propietarios, algunos animales presentaron depresión, anorexia y llanto persistente; aunque la

mayoría murió sin presentar signos clínicos y las madres tampoco parecían tener algún signo que indique en enfermedad. Esto hace pensar que presumiblemente se habrían producido 2 casos de EHC, en los que los cachorros más fuertes y mejor nutridos lograron sobrevivir. Sin embargo estos últimos son probablemente portadores de por vida y fuente de infección esporádica del VHC-1.

El herpesvirus canino puede producir además de abortos y mortalidad neonatal, reabsorción embrionaria y en algunos casos momificaciones fetales (Hashimoto y col., 1983; Poste y King, 1971, citados por Ronsse y col., 2003). En el presente estudio, una hembra con un antecedente de aborto y a la que se le diagnosticó luego por medios ecográficos una reabsorción embrionaria, resultó seropositiva a herpesvirus canino. Lo que indicaría que hubo exposición al virus y este pudo ser el responsable de uno o ambos episodios.

El VHC-1 puede transmitirse a través del útero durante la gestación, así las perras preñadas infectadas durante los dos últimos tercios de gestación pueden abortar. (Carmichael y Greene, 1998). También la reactivación viral producto de la inmunosupresión ocasionada por el uso de corticoides o el estrés, puede ocasionar el mismo problema (Okuda y col, 1993). Una de las perras evaluadas que presentó un episodio de aborto a los 30 días del servicio y que además se le descartó la presencia de anticuerpos contra *Brucella sp.*, dió positivo a la prueba contra herpesvirus canino. Teniendo en cuenta que la prueba empleada sólo detecta inmunoglobulina G, la posible causa del aborto sería una reactivación viral, ya que de ser producto de una infección reciente no se hubiera podido detectar aún dichos anticuerpos.

Cuando ocurre una infección en cachorros susceptibles por el VHC-1 antes de cumplir las 2 semanas de vida, ya sea a través del útero, el canal del parto o por contacto directo con secreciones de algún animal infectado, se produce la EHC que ocasiona alta mortalidad dentro de la camada (Carmichael, 1999). En este estudio resultaron positivos a herpesvirus canino 2 perras cuya mortalidad de crías fue alta durante el primer mes siguiente al parto. Según los propietarios todos los cachorros afectados murieron uno tras otro casi sin presentar signos clínicos, evidenciando algunos solamente depresión y llanto persistente antes de la muerte, la que ocurría de

un día para otro. Esta descripción coincide con las publicadas por distintos autores respecto a la presentación de esta enfermedad (Ronsse y col., 2003; Carmichael y Greene, 1998), por lo tanto es probable que la causa de estos decesos haya sido la infección generalizada por el VHC-1.

La presencia del Virus Herpes Felino tipo 1 no se conoce en nuestro país, sólo se sabe de algunas lesiones sugerentes encontradas por los veterinarios dedicados a la práctica en pequeños animales (Díaz, comunicación personal). Sin embargo no sería prudente descartar el hecho que se haya producido en alguno de los animales seropositivos a VHC-1, una reacción cruzada entre éstos agentes. Aunque esta posibilidad se ve reducida en vista que en ninguno de los hogares de los animales en cuestión se tenían gatos como mascotas.

VI. CONCLUSIONES

- Existe al menos un 10 % de serorreactores al Virus Herpes Canino tipo 1 entre la población canina de la provincia de Lima, con antecedentes relacionados a problemas reproductivos.
- Los serorreactores son de diferente edad, sexo, raza y provienen de los distritos de Cieneguilla, Lurín, La Molina, San Borja, San Juan de Lurigancho y San Juan de Miraflores pertenecientes a la provincia de Lima.

VII. RECOMENDACIONES

- Es necesaria la detección del antígeno de VHC-1 en los tejidos de animales afectados por la enfermedad así como el aislamiento viral para su caracterización.
- La presencia de anticuerpos contra VHC-1 en animales con problemas reproductivos en nuestro país, hace necesario su inclusión dentro del diagnóstico diferencial de los problemas reproductivos en los caninos.
- Se necesita más estudios destinados a establecer el rol que desempeña este agente en los casos de mortalidad neonatal y problemas reproductivos en la población canina de nuestro país.

VII. BIBLIOGRAFIA

AHLBOM, A.; S. NORELL. 1990. Introduction to modern epidemiology. 2^a ed. p 24 - 29. Epidemiology Resource Inc. USA.

BURR, P.; M. CAMPBELL; L. NICOLSON; D. ONIONS. 1996. Detection of Canine Herpesvirus 1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 53: 227-237.

CARMICHAEL, L. 1999. Enfermedades virales de los cachorros recién nacidos. Estado actual del Herpesvirus canino y virus diminuto de los caninos (Parvovirus canino-1). En: International Veterinary Information Service. New York. On line www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/carmichael_es/chapter_frm.asp?LA=2. Visto: 8 de diciembre de 2004.

CARMICHAEL, L.; B. MEDIC. 1978. Small – Plaque Variant of Canine Herpesvirus Wiht Reduced Pathogenicity for Newborn Pups. *Am. Soc. Microbiol.* 20 (3): 108-114.

CARMICHAEL, L.; C. GREENE. 1998. Infección por Herpesvirus Canino En: Greene. Enfermedades infecciosas de perros y gatos. 2^a ed. p. 31-36 Ed. Interamericana Mc Graw- Hill. México.

CORRADA, Y.; D. AVERSA; C. COBELLO. 2002. Herpesvirus canino: relevancia en la reproducción. Revista de Medicina Veterinaria. N° 2. On line: http://comunidad.ciudad.com.ar/ciudadanos/socmedvetar/_private/revista.htm. Visto: 15 de febrero de 2005.

DANIEL, W. 1996. Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. 5ª ed. p 205-207. Ed. Limusa. México.

FENNER, F.; P. BACHMAN; E. GIBBS; F. MURPHY; M. STUDDERT; D. WHITE. 1992. Virología Veterinaria. P. 349-371. ed. Acribia. España- Zaragoza.

HAANES, E.; C.TOMLINSON. 1998 Genomic organization of the canine herpesvirus US region. *Virus Res.* 53: 151-162.

HARDER, T.; M. HARDER; R. DE SWART; A. OSTERHAUS; B. LIESS. 1998. Major immunogenic proteins of phocid herpes-viruses and their relationship to proteins of canine and feline herpesviruses. *Vet. Q.* 20: 50-55.

LIMBACH, K.; M. LIMBACH; D. CONTE; E. PAOLETTI. 1994. Nucleotide sequence of the genes encoding the canine herpesvirus gB, gC, gD homologues. *J. Gen. Virol.* 75: 2029-2039.

LIMCUMPAO, J.; T. HORIMOTO; X. XUAN; E. TAKAHASHI; T. MIKAMI. 1990. Immunological relationship between feline herpesvirus type1(FHV-1) and canine herpesvirus (CHV) as revealed by polyvalent and monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 111: (3-4) 165-76.

MERCK. 2000. El manual merck de veterinaria. 5ª ed. p 618-619. Ed. Océano. Barcelona.

MIYOSHI, M.; Y. ISHII; M. TAKIGUCHI; A. TAKADA; J. YASUDA; A. HASHIMOTO; K. OKAZAKI; H. KIDA. 1999 Detection of canine herpesvirus DNA

in the ganglionic neurons and the lymph node lymphocytes of latently infected dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 61: 375-379.74

MORGAN, R.; R. BRIGHT; M. SWARTOUT. 2003. Clínica de pequeños animales. 4ª ed. p 1093-1094. Ed. Elsevier. Madrid.

NAVARRO, C.; M. CELEDÓN.; J. PIZARRO. 2003. Detección de virus herpes canino tipo 1 en Chile. *Arch. Med. Vet.* 35 (2): 243-248.

NISHIKAWA, Y.; X. XUAN; M. KIMURA; H. OTSUKA. 1999. Characterization of pseudorabies virus glycoprotein B expressed by canine herpesvirus. *J. Vet. Med. Sci.* 61: 1113-1117

NISHIKAWA, Y.; H. IKEDA; S. FUKUMOTO; X. XUAN; H. NASAGAWA; H. OTSUKA; T. MIKAMI. 2000. Immunization of dogs with a canine herpesvirus vector expressing *Neospora caninum* surface protein, NcSRS2. *Int. J. Parasitol.* 30 : 1167-1171.

OKUDA, Y.; A. HASHIMOTO; T. YAMAGUCHI; H. FUKUSHI; S. MORI; M. TANI; K. HIRAI; L. CARMICHAEL. 1993. Repeated Canine Herpesvirus (CHV) reactivation in dogs by an immunosuppressive drug. *Cornell Vet.* 83: 291-302.

POULET, H. ; P. GUIGAL; M. SOULIER ; V. LEROY ; G. FAYET ; J. MINKE ; G. CHAPPUIS. 2001. Protection of puppies against canine herpesvirus by vaccination of the dams. *Vet. Rec.* 148: 691-695.

READING, M.; H. FIELD. 1998. A serological study of canine herpesvirus-1 infection in the english dog population. *Arch. Virol.* 143: 1477-1478.

REMOND, M.; P. SHELDRIK ; F. LEBRETON ; P. NARDEUX; T. FOULON. 1996. Gene organization in the UL region and inverted repeats of the canine herpesvirus genome. *J. Gen. Virol.* 77: 37-48..

RONSSSE, V.; H. POULET; J. VERSTEGEN ; E. THIRTY. 2003. L 'herpe'svirose canine. *Ann. Méd. Vét.* 2003. 147: 65-76.

RONSSSE, V.; J. VERSTEGEN ; K. ONCLIN ; F. FANIR ; H. POULET. 2004. Risk factors and reproductive disorders associated whit canine herpesvirus-1 (CHV-1). *Theriogenology.* 61: 619-636.

TANAKA, T.; S. NAKATANI; X. XUAN; H. KUMURA; I. IGARASHI; K. SHIMAZAKI. 2003. Antiviral activity of lactoferrin against canine herpesvirus. *Antiviral Research.* 60: 193-199.

TARRADAS, C.; I. LUQUE; A. MALDONADO; A. ARENAS.2002. Herpesvirus En: Vadillo CE. Manual de Microbiología Veterinaria. P. 587- 602. ed. Mc Graw-Hill col. Interamericana. Madrid.

VADILLO, S.; S. PIRIZ; E. MATEOS. 2002. Virus características generales. In: Vadillo CE. Manual de Microbiología Veterinaria. P. 175-187. ed. Mc Graw-Hill col. Interamericana. Madrid.

XUAN, X.; T. HORIMOTO; J. LIMCUMPAO; Y. TOHYA; E. TAKAHASHI; T. MIKAMI. 1992. Glycoprotein-specific immune response in canine herpesvirus infection : Brief report. *Arch. Virol.* 122: 359-365.

XUAN, X.; A. KOJIMA; T. MURATA; T. MIKAMI; H. OTSUKA. 1997. Analylisis of canine herpesvirus gB, gC and gD expressed by a recombinat vaccinia virus. *Arch Virol.* 142(5) 1003-1008.

XUAN, X.; K. TUCHIYA; Y. NISHIKAWA; Y. ONODERAZ; Y. TAKASHIMA; A. YAMAMOTO; A. KATSUMATA; A. IWATA; S UEDA; T. MIKAMI; H. OTSUKA. 1998. Biological and immunogenic properties of rabies virus glycoprotein expressed by canine herpesvirus vector. *Vaccine.* 16, 969-976

ANEXO N° 1

IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL MUESTREADO

N° de suero:

Sexo:

Raza:

Edad:

ANTECEDENTES

Primípara SI NO

Múltipara SI NO

N° de partos normales

N° de partos distócicos

Abortos SI NO

N° de abortos

N° de crías abortadas

Mortalidad de crías durante el 1er mes **Bajo** **Medio** **Alto**
Especificar en número o porcentaje

Signos clínicos observados antes de la muerte:
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Contacto con animales del extranjero SI NO

De que países.....

Método de reproducción: I A M N

Origen de los reproductores: Extranjero

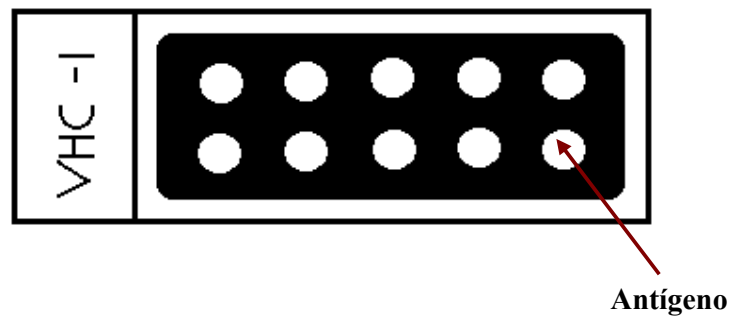
Nacional

ANEXO N° 2

PRUEBA: Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

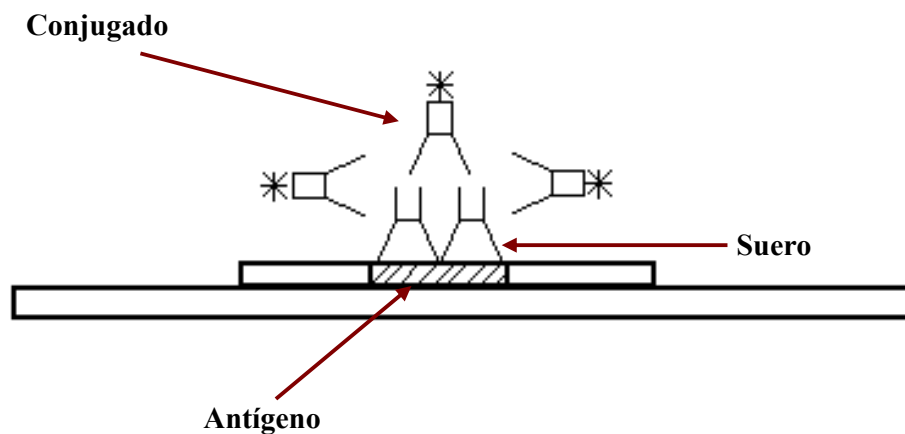
KIT COMERCIAL: Veterinary Medical Research and Development (VMRD). Pullman. WA. Estados Unidos).

Lámina portaobjeto para IFI



Antígeno: Cultivo celular de riñón canino, infectado con Virus Herpes Canino tipo 1, fijado en los pocillos de la lámina.

Prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes



Conjugado: Inmunoglobulina G anti-canina marcada con fluorocromo (ITFC).