



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y LA SALUD
ANIMAL.**

**“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y PRIMER ESTUDIO DE SEROPREVALENCIA
DE HERPESVIRUS CANINO (CHV-1) EN MÉXICO”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

MVZ EDGAR GUILLERMO VALDIVIA LARA

TUTOR PRINCIPAL: Dr. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO FES-C UNAM

COMITÉ TUTORAL: Dra. BLANCA LILIA BARRÓN ROMERO ENCB-IPN

Dra. LAURA COBOS MARÍN FMVZ-UNAM

Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Octubre del 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo fue realizado con el apoyo del proyecto PAPIIT IT-202114 “Evaluación de la enfermedad de herpesvirus canino en México y desarrollo de posibles medidas para su control y prevención”, bajo la asesoría de los Doctores Juan Antonio Montaraz Crespo y Guillermo Valdivia Anda, con el apoyo de la beca otorgada por el CONACyT.

Las Doctoras Blanca Lilia Barrón Romero y Laura Cobos Marín fungieron como miembros del comité tutorial.

Se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Patogenicidad Microbiana de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal de la FESC, Campo 4, así como en el Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario (DIVET) en Cuautitlán Izcalli, estado de México.

DEDICATORIAS.

A mi asesor, el Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo, por todo el apoyo, los consejos y la amistad que me ha brindado en todo momento.

A mis asesoras, Dra. Laura Cobos Marín y Dra. Blanca Lilia Barrón Romero, por su invaluable ayuda, por compartir conmigo su inmenso conocimiento y calidad humana.

A mis padres, por ser parte fundamental en cada paso en mi vida, por ser consejeros y asesores, por siempre apoyarme en cada decisión que he tomado.

A Jessy, parte fundamental en la realización de las pruebas, cultivo celular, PCR, etc. Por ser mi compañera, amiga y la mejor novia.

A mi hermana por siempre ser un ejemplo a seguir de perseverancia y valor.

A mis amigos, socios, colegas, compadres y colaboradores Leonardo, Max y Oscar.

A mis amigos de vida Victor, Churro, Itzel, Jorge, Rodrigo, Carlitos, Eridani, Majiva, Lynette, Vane, Sonia, Dana, Karlita, Baduel, Karen.

A los miembros del jurado, Dra. Susana Mendoza, Dra. Elizabeth Loza, Dr. Francisco Basurto y Dr. Humberto Ramirez por sus atinadas observaciones.

INDICE

RESUMEN	i
1.INTRODUCCIÓN	1
1.1 Clasificación del herpesvirus canino tipo 1	1
1.2 Estructura y ciclo viral	4
1.3 Patogénesis y signos clínicos	11
1.4 Latencia en el chv-1	17
1.5 Diagnóstico	21
1.6 Seroprevalencia	23
1.7 Tratamiento.....	26
1.8 Vacunación y procedimientos profilácticos	27
2. JUSTIFICACIÓN	30
3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVO GENERAL	31
5. OBJETIVOS PARTICULARES	31
6. MATERIAL Y MÉTODOS	32
7. RESULTADOS	49
8. DISCUSIÓN	82
9. CONCLUSIONES	93
10. BIBLIOGRAFÍA	94

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Recopilación de las Seroprevalencias encontradas en diferentes países alrededor del mundo.	24
Tabla 2. Condiciones del proceso de reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación de un fragmento del gen de la ADN polimerasa.	36
Tabla 3. Efectos sobre las células MDCK por los aislamientos de CHV-1.	58
Tabla 4. Título de anticuerpos anti CHV-1 calculado mediante la prueba de ELISA EVL™ de los animales muestreados.	67
Tabla 5. Comparaciones múltiples para título calculado por criadero 95% LSD.	71
Tabla 6. Comparaciones múltiples para título calculado por raza 95% LSD.	72
Tabla 7. Conteo de focos peroxidasa positivos para la titulación del CHV-1.	74
Tabla 8. Tabulador de los individuos muestreados y el título de seroneutralización.	75
Tabla 9. Cuadro de contingencia para validar la técnica de ELISA con respecto a la seroneutralización.	77
Tabla 10. Valoración del coeficiente kappa de acuerdo a Landis y Koch, 1977.	78
Tabla 11. Cuadro de contingencia donde se explica la generación de conceptos para la interpretación.	79

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Estructura del CHV-1 (herpesvirus canino)	1
Figura 2. Árbol filogenético para los herpesvirus.	3
Figura 3. Acúmulos funcionales ("Clusters") de las proteínas de envoltura en HSV-1.	6
Figura 4. Los diferentes pasos de la salida del virión de las células infectadas	7
Figura 5a. Dos pasos de la entrada viral: La unión y la fusión con la célula hospedadora.	8
Figura 5b. Rutas de entrada de herpesvirus	8
Figura 6. Patogenia y manifestación de las infecciones con CHV-1.	17
Figura 7. Localización del CHV-1 durante la latencia, relacionado con el sitio de replicación viral.	19
Figura 8. Órganos de un cachorro de 13 días de edad que murió espontáneamente de infección con CHV-1.	22
Figura 9. Distribución de seroprevalencias de acuerdo a la Tabla 1 del presente trabajo.	26
Figura 10. Ciclos de temperatura y tiempo para la amplificación de un fragmento del gen de la ADN polimerasa.	35
Figura 11. Ciclos de temperatura y tiempo para la amplificación de un fragmento del gen de la glicoproteína B.	39
Figura 12. Organografía después de remover el esternón y abrir la cavidad abdominal CHV-1 FESC 2.	50
Figura 13. Hígado CHV-1FESC 2.	50
Figura 14. Ojo CHV-1FESC 2.	50
Figura 15. Pulmones CHV-1FESC 2.	50
Figura 16. Encéfalo CHV-1FESC 2.	51
Figura 17. Riñones CHV-1FESC 2.	51
Figura 18. Microfotografía de pulmones.	52
Figura 19. Microfotografía de riñones.	53
Figura 20. Microfotografía de bazo.	53
Figura 21. Microfotografía de hígado.	54
Figura 22. Microfotografía de hígado.	54
Figura 23. Microfotografía de intestino.	54
Figura 24. Microfotografía de encéfalo.	55
Figura 25. Resultados de inmunofluorescencia.	56
Figura 26. Electroforesis en agarosa al 3% del amplificado por PCR de un fragmento del gen de la ADN polimerasa.	57
Figura 27. Efectos citopáticos del CHV-1 sobre células MDCK en monocapa, 48 horas post infección.	58
Figura 28. Resultados de inmunofluorescencia sobre cultivo celular.	59
Figura 29. Electroforesis en agarosa al 3% del amplificado por PCR de un fragmento del gen de la ADN polimerasa.	60
Figura 30. Electroforesis en agarosa al 3% del amplificado por PCR de un fragmento del gen de la glicoproteína B.	60
Figura 31. Microfotografías electrónicas de transmisión.	61
Figura 32. Distribución de caninos por criadero.	62
Figura 33. Distribución de caninos por raza.	63
Figura 34. Encuesta realizada a criadores, dueños de los caninos muestreados.	64
Figura 35. Relación de la densidad óptica obtenida, con el título supuesto del control positivo.	66
Figura 36. Seroprevalencia por la técnica de ELISA de los caninos muestreados.	69
Figura 37. Medias e intervalos LSD (95%) del título calculado por criadero.	71
Figura 38. Medias e intervalos LSD (95%) del título calculado por raza.	72
Figura 39. Focos peroxidasa positivos sobre cultivo celular. Células MDCK a las 72 horas de incubación.	74
Figura 40. Regresión simple Título de ELISA contra Título de Seroneutralización.	76

LISTA DE ABREVIATURAS.

AFT	Ácido fosfotúngstico
CHV-1	Herpesvirus canino tipo 1
EP	Embrión de pollo
HE	Tinción de hematoxilina y eosina
HSV-1	Herpes simplex tipo 1
HVEM	<i>Herpesvirus entry mediator</i> , Mediador de la entrada de herpesvirus.
IF	Inmunofluorescencia
LAT's	<i>Latency associated transcripts</i> , transcriptos asociados a latencia.
MET	Microscopía electrónica de transmisión
OD	Densidad óptica
ori	Secuencia de origen de replicación de ADN
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
RTG	Red trans Golgi
SN	Seroneutralización
UFFPP	Unidades formadoras de focos peroxidasa positivos
UFP	Unidades formadoras de placa
VHS	<i>Virion host shutoff</i> , Proteína de "cancelamiento" celular.
VP16	<i>Viral protein 16</i> , Proteína viral 16
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
VZV	Virus de varicela zoster
α TIF	<i>Transcription factor for alpha genes</i> , Factor de transcripción para los genes alfa.

RESUMEN

El presente trabajo presenta los primeros aislamientos documentados de herpesvirus canino (CHV-1) en el país, un virus que ocasiona una infección hemorrágica generalizada en cachorros miembros de la familia *Canidae*.

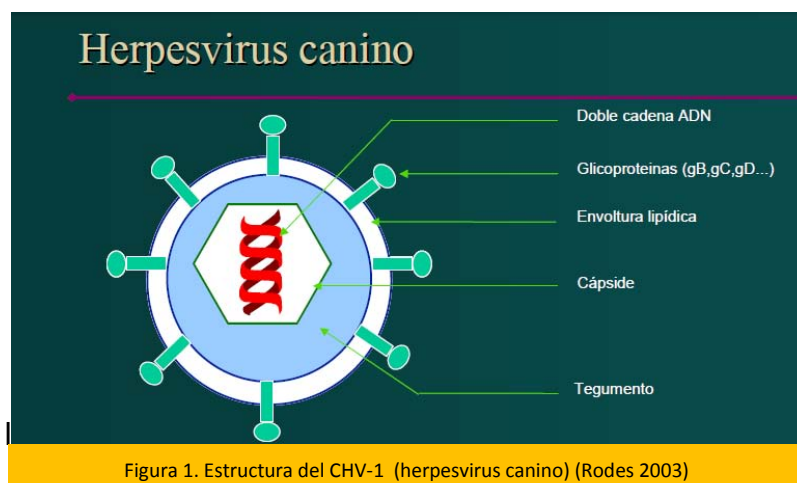
Dichos aislamientos se obtuvieron a partir de cachorros muertos dentro de las primeras cuatro semanas de edad y que presentaron lesiones patológicas compatibles con herpesvirosis canina. Las lesiones más relevantes fueron hemorragias petequiales y equimóticas en riñones, hígado y pulmones, nefritis intersticial proliferativa, necrosis multifocal en hígado y riñones, así como encefalitis con cuerpos de inclusión intranucleares. La presencia del virus se confirmó mediante inmunofluorescencia, microscopía electrónica y reacción en cadena de la polimerasa.

Además, es el primer estudio serológico reportado en el país, encontrándose una seropositividad del 87%, mediante la técnica de ELISA, en caninos de criaderos de la zona cercana a la FES-Cuautitlán.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Clasificación del herpesvirus canino tipo 1

Los herpesvirus se pueden distinguir morfológicamente de una manera sencilla de otros virus (Davison y col. 2009; Roizmann y col. 1992). Un herpesvirión típico varía desde 120 a 300 nm de tamaño, consiste en un núcleo con un genoma lineal de doble cadena de ADN de 125-290 kpb (kilo pares de bases), una cápside icosaédrica, tegumento y envoltura (Davison y col. 2009; Roizmann y Baines 1991). La cápside tiene aproximadamente 100 a 110 nm de diámetro que incluye 162 (150 hexaméricos y 12 pentaméricos) capsómeros (Roizmann y col. 1992; Roizmann y Baines 1991; Field y col. 2006). El tegumento consiste en una matriz proteínica y está rodeada por la envoltura con numerosas proyecciones glicoprotéicas (Davison y col. 2009; Roizmann y col. 1992) (figura 1).

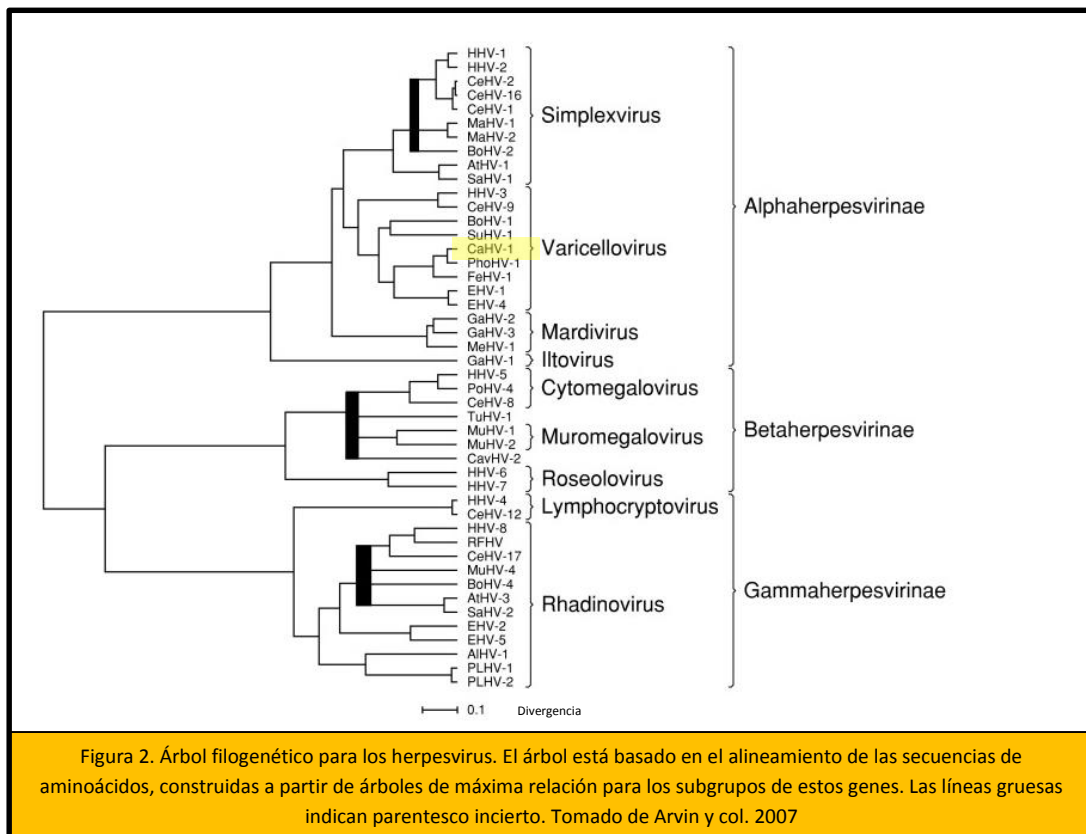


La subfamilia alfa de los herpesvirus se encuentra muy diseminada entre humanos, animales domésticos y silvestres, con seroprevalencias tan altas como del 90% en algunas especies (Davison y col. 2009; Field y col. 2006). Presentan un espectro de hospedadores variable, algunas especies tienen un amplio rango de hospederos, como es el caso del virus de la pseudorrabia que puede afectar a cerdos, caninos, felinos, etc; mientras que otras especies presentan un rango de hospederos muy cerrado, como el caso del CHV-1 (Herpesvirus canino tipo 1) (Davison y col. 2009).

Los alfa herpesvirus se caracterizan por un ciclo productivo relativamente corto, rápida diseminación en cultivo con destrucción de las células infectadas y la habilidad de establecer latencia que puede durar toda la vida, principalmente en ganglios sensoriales (Jones 1998; Roizmann y col. 1992).

Los alfa herpesvirus son neurotrópicos con afinidad por las estructuras neurales (Mettenleiter 2003). Pueden causar infecciones subclínicas, enfermedades sistémicas severas, o enfermedades confinadas al sistema nervioso central (Borchers y col. 1999; Decaro y col. 2008; Gacek 2002).

El CHV-1 es un virus DNA de doble cadena que pertenece a la Familia *Herpesviridae*, Subfamilia *Alphaherpesvirinae*, Género *Varicellovirus* (Arvin y col. 2007) (figura 2). El Herpesvirus canino tipo 1 es parecido, filogenéticamente, a los alfa herpesvirus que afectan a otras especies, pero existen receptores específicos en la superficie de las células que ocasionan que el virus tenga un rango de hospederos muy restringido para los perros domésticos y otros miembros de la familia *Canidae* (Greene 2012).



Carmichael y Barnes (1969) estudiaron el crecimiento del CHV-1 en cultivos de células renales de caninos y en cultivos de macrófagos caninos, y demostraron que la temperatura óptima para el crecimiento viral máximo era a los 35-36°C. El virus presenta un tropismo hacia las células epiteliales de la mucosa de las vías aéreas altas y el tracto reproductor, donde se encuentra esta temperatura óptima para su replicación (Greene 2012).

Únicamente se ha reconocido un serotipo de herpesvirus canino, aunque es posible que otros aislamientos o cepas de CHV-1 presenten diferente virulencia para los tractos respiratorio y genital (Ronsse y col. 2004).

El virus es inactivado a pH menor de 5 y mayor de 8, con la exposición a los desinfectantes comunes, a los solventes lipídicos y al calentamiento por encima de los 40°C (Greene 2012). El virus es sensible y rápidamente destruido cuando

se expone a factores ambientales, por lo que la transmisión se da por contacto directo con secreciones de mucosas.

1.2 Estructura y ciclo viral

Estudios realizados con CHV-1 han demostrado que aunque el herpesvirus canino difiere de otros herpesvirus por tener un rango de hospedadores muy restringido (Strandberg y col. 1969), la estructura y el patrón de desarrollo viral en las células permisivas es muy similar a los descritos previamente para el Herpes simplex humano (HSV-1) (Strandberg y col. 1969; Aurelian 1969). Se describirá la estructura y el ciclo viral para el HSV-1, ya que se dispone mayor información.

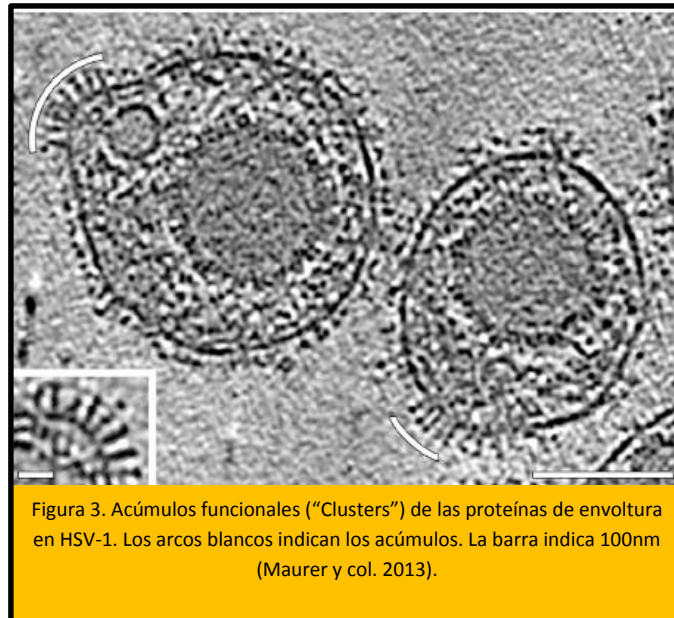
En el HSV-1, el ADN genómico se encuentra empaquetado dentro de la nucleocápside, presenta cerca de 153 kb (Zhou y col. 1999; Alexander y col. 2000). La estructura tan compacta de los herpesvirus sugiere que el genoma de los herpesvirus se empaqueta “desnudo”, es decir, sin proteínas de tipo histona asociadas (Newcomb y col. 2001).

El tegumento ocupa el espacio entre la cápside y la envoltura. La cápside y el virión son de ~125nm y ~220 nm de diámetro, respectivamente. El tegumento representa una parte significativa del virión, y contiene aproximadamente el 40% de su masa protéica (Gibson 1996). El tegumento contiene más de 20 proteínas diferentes codificadas por el virus (Roizman y Knipe 2001), las más notables incluyen la VP16 o α TIF (del inglés *Viral protein-16* o *Transcription factor for alpha genes*), y la proteína VHS (del inglés *virion host shutoff*). La VP16 actúa como un activador de la transcripción de los genes de transcripción inmediata del virus, además de ser una proteína estructural del tegumento (Preston y col.

1988). La proteína VHS es una RNasa que degrada la mayoría de los RNAm del hospedero durante la fase inicial de la infección viral, facilitando la expresión genética del virus (Everly y col. 2002). Entre las proteínas de cápside relevantes se encuentran las VP5 y VP26, las cuales forman los pentones y hexones. Las proteínas VP1-2 se asocian a un complejo que se une a la secuencia alfa terminal del genoma, el cual contiene señales para el empaquetamiento del genoma en la cápside (Chou y Roizman 1989).

La envoltura contiene la mayoría de las glicoproteínas del virión. El genoma de los herpesvirus codifica entre 10 y 12 glicoproteínas, algunas de ellas son altamente conservadas entre todos los herpesvirus (Kieff y Rickinson 2001). El HSV-1 contiene aproximadamente 80 genes, de los cuales 30 codifican para proteínas del virión, entre las que se encuentran las glicoproteínas de la envoltura (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL y gM) (Roizman y Knipe 2001), siendo cinco de éstas las más importantes (gB, gC, gD y el complejo gH y gL) (Maurer y col. 2009).

A nivel ultraestructural, las glicoproteínas forman “spikes” (proyecciones) largos, cada uno formado por un solo tipo de glicoproteína. La envoltura contiene de 600 a 750 proyecciones que varían en longitud, espaciado y en angulación. Su distribución en la envoltura sugiere acúmulos funcionales (Grunewald y col. 2003) (figura 3).



Estas moléculas glicoprotéicas participan en la inducción de las respuestas inmunes celulares y humorales en el hospedador. Además de las glicoproteínas, la envoltura también contiene numerosas proteínas del hospedador. (Compton y col. 2003).

La envoltura viral se adquiere, en primera instancia, en la membrana interna del núcleo, misma que intercambia con el sistema membranal del citoplasma (SER, Aparato de Golgi) y a lo largo de este trayecto adquiere las proteínas del tegumento en el Aparato de Golgi. (Mettenleiter y col. 2006) (Figura 4).

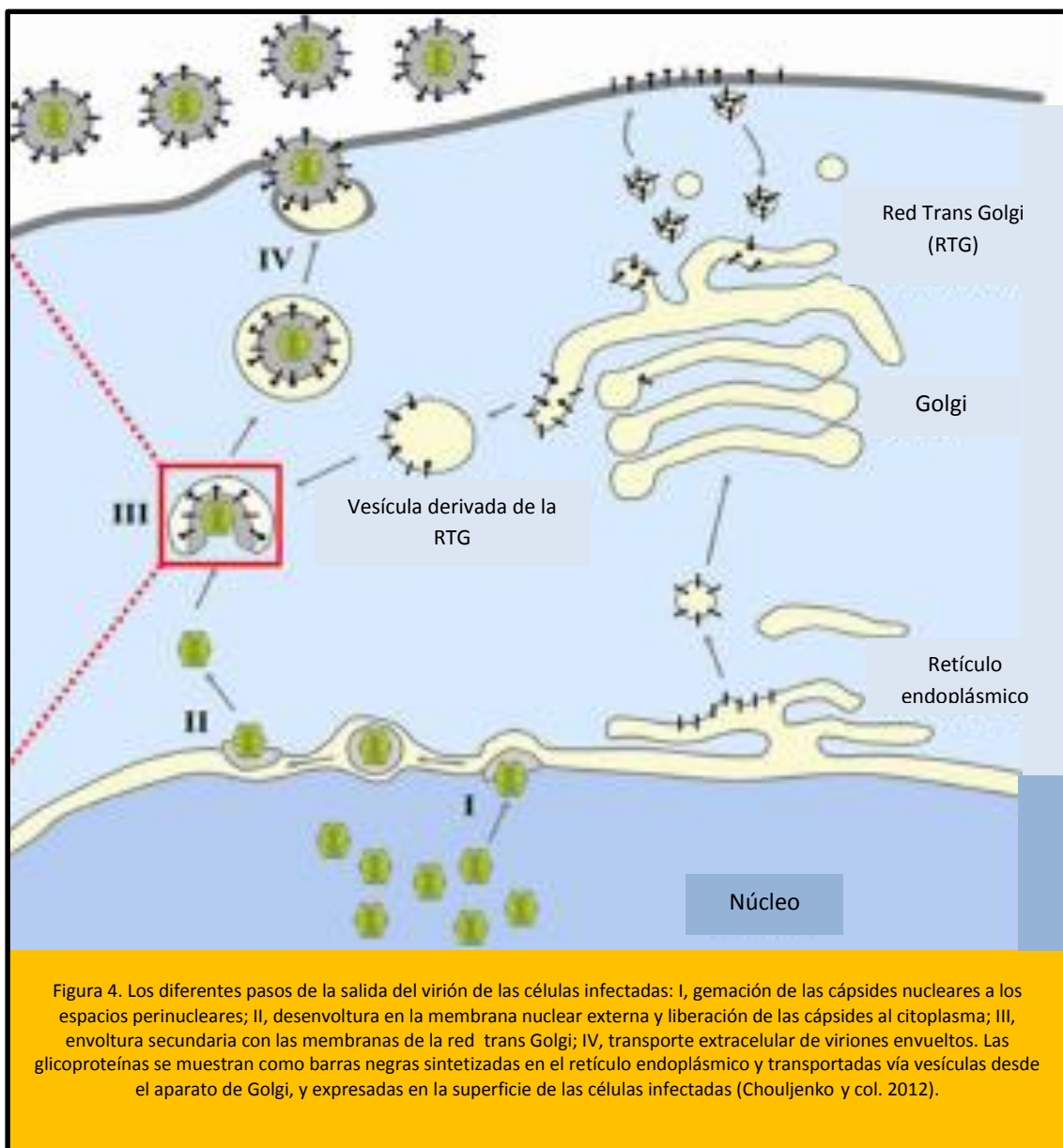
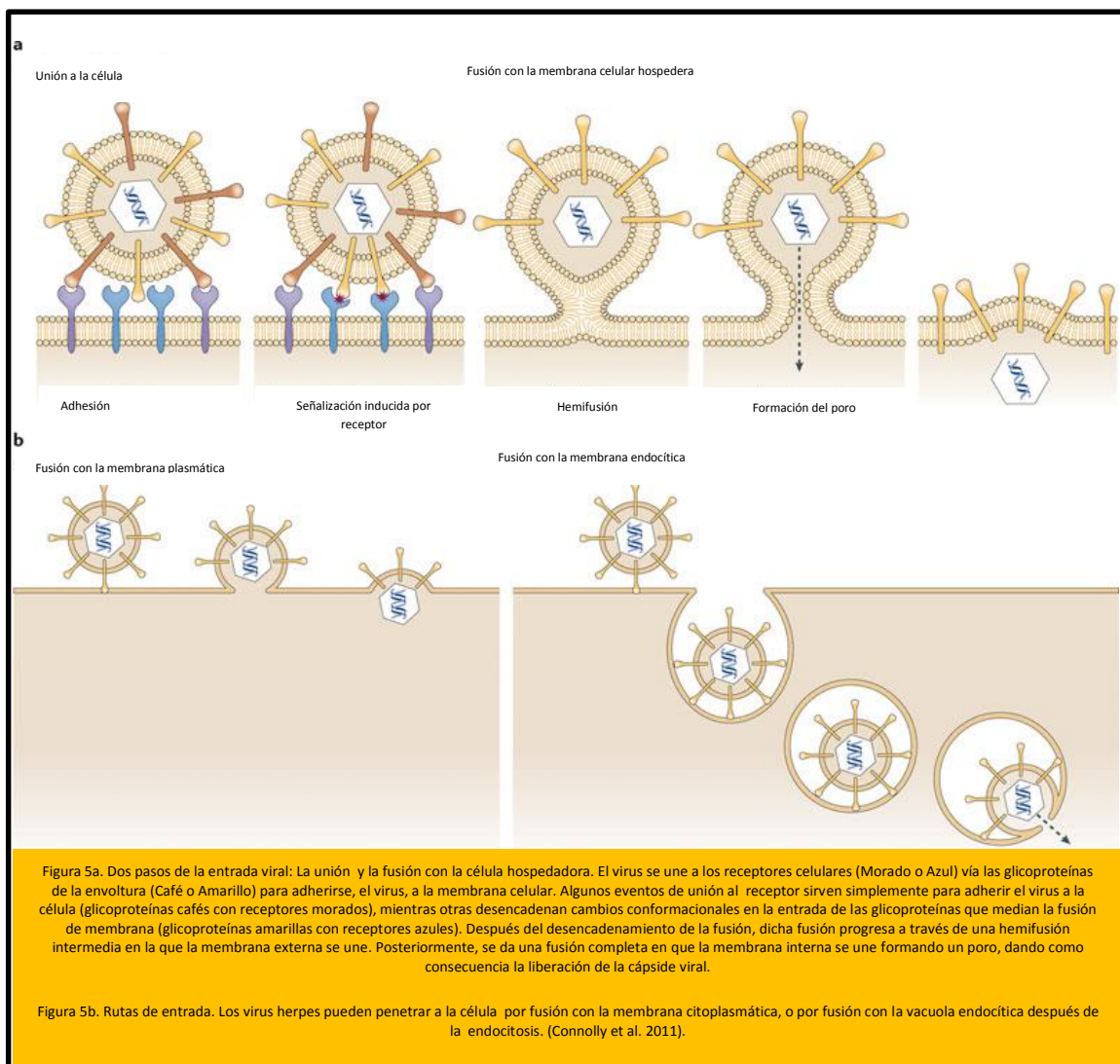


Figura 4. Los diferentes pasos de la salida del virión de las células infectadas: I, gemación de las cápsidas nucleares a los espacios perinucleares; II, desdoblamiento en la membrana nuclear externa y liberación de las cápsidas al citoplasma; III, envoltura secundaria con las membranas de la red trans Golgi; IV, transporte extracelular de viriones envueltos. Las glicoproteínas se muestran como barras negras sintetizadas en el retículo endoplásmico y transportadas vía vesículas desde el aparato de Golgi, y expresadas en la superficie de las células infectadas (Chouljenko y col. 2012).

La entrada del HSV-1 es de tipo celular específica, por ejemplo, en los cultivos celulares de neuronas y células VERO la entrada es por fusión entre la envoltura viral y la membrana plasmática con la subsecuente liberación de la cápside en el citosol; mientras que en los queratinocitos y las células HeLa, el primer paso de entrada necesita de endocitosis, sin embargo, en ambas situaciones existe una fusión de membranas (Nicola y col. 2005). Después de una adhesión inicial, mediante una interacción no esencial de la gC con los proteoglicanos heparán

sulfato de la membrana plasmática, la entrada prosigue con la unión de la gD a alguno de los tres receptores celulares conocidos, el mediador de la entrada de herpesvirus (HVEM, por sus siglas en inglés, *Herpesvirus entry mediator*), nectina-1 o 2, o un heparán sulfato modificado (Spear 2004). El heterodímero gH/gL y el homotrímero gB se requieren para la fusión de membranas (Maurer y col. 2008) (figuras 5a y 5b).



Después de la fusión, la nucleocápside liberada, y proteínas del tegumento, viajan a través de los microtúbulos a los poros nucleares, en donde se libera el

ADN hacia el núcleo. Se ha calculado que, sin la ayuda de los microtúbulos, le tomaría a las nucleocápsides 231 años en moverse 10 mm en el citoplasma axonal (Sodeik 2000). Mediante la transportación por medio de microtúbulos, las cápsides son capaces de moverse a una velocidad de $1.1\mu\text{m/s}$ (Smith y col. 2001).

Los genes codificados por los herpesvirus son transcritos por la ARN polimerasa II celular y sucede en una organización de tiempo que involucra tres grupos mayores de genes. El primer grupo consiste en los genes “muy tempranos” o α , los cuales se definen como aquellos que son transcritos en ausencia de síntesis proteica *de novo*. Estos genes regulan la expresión subsecuente de otros genes. El siguiente grupo, los genes “tempranos” o β , codifican a las enzimas involucradas en el metabolismo de nucleótidos y la replicación del genoma viral, así como múltiples glicoproteínas de la envoltura. El último grupo, los genes “tardíos” o γ , requieren de la síntesis del ADN viral para su expresión (Beurden y col. 2013)

En las infecciones por HSV-1, los primeros genes en transcribirse son los genes muy tempranos que se diferencian de los genes tempranos y tardíos por una secuencia específica en la región de los promotores de los genes muy tempranos. Este elemento es reconocido por una proteína de tegumento viral, la VP16, la cual se une como parte de un complejo protéico que contiene dos factores de la célula, Oct-1 y HCF. Este complejo de proteínas activa la transcripción de los genes muy tempranos (Kristie y col. 1989).

Los promotores de los genes tempranos, a diferencia de los de los genes muy tempranos, no contienen secuencias responsivas a VP16, sin embargo,

contienen elementos que se unen a activadores transcripcionales celulares, incluido Sp1. En contraste, los promotores de los genes tardíos carecen de estas secuencias (Ruyechan y col. 2013).

Replicación del ADN viral.

La replicación del ADN de los herpesvirus tipo alfa ha sido objeto de intenso estudio durante los últimos años. El interés en la materia no únicamente depende de una curiosidad por conocer este paso del ciclo viral, sino porque la replicación del ADN viral es un blanco muy útil para la terapia antiviral, como se ha demostrado con agentes como el Aciclovir.

Existen más de 30 especies de herpesvirus tipo alfa infectando a los organismos. Sus genomas recaen en dos principales categorías, ya sean similares a HSV-1 o similares a VZV, con dos a cuatro formas isoméricas cada uno. Todos los genomas de herpesvirus tipo alfa contienen cuatro componentes estructurares, secuencias únicas cortas (U_s) y largas (U_L) que codifican genes de una sola copia, y regiones repetidas invertidas que se unen con las regiones únicas. La replicación de ADN inicia en las secuencias origen (*ori*), existiendo de dos a tres en cada genoma. Las evidencias indican que únicamente se requiere de un *ori* para la replicación del ADN, aún se desconoce si existe una función para el o los otros sitios *ori* (Roizman y Knipe 2001, Balliet y col. 2005).

La replicación del ADN se da en el núcleo, y se sabe que el ADN viral se circulariza inicialmente, después, la síntesis inicia en el origen y continúa de forma bidireccional. Poco después, el tipo de síntesis cambia a un modo de círculo, donde los amplificados genómicos de tamaño completo se desprenden y empaquetan conforme se van produciendo (Falkenberg y col. 2000).

Como en todos los herpesvirus, las nucleocápsides del HSV se ensamblan en el nucleoplasma (Muranyi y col. 2002).

1.3 Patogénesis y signos clínicos.

Las infecciones con el CHV-1 se pueden manifestar de diferentes maneras, dependiendo de la edad, género, sistema inmune y la ruta de transmisión.

Infección durante la gestación.

Hashimoto y colaboradores, en 1983, demostraron que la reactivación viral o una infección primaria con el CHV-1 durante la gestación pueden ocasionar transmisión transplacentaria al feto. En general, los virus pertenecientes a la familia *Herpesviridae*, pueden transmitirse en forma transplacentaria y ocasionar lesiones necróticas en la pacentia, como se describe en otros mamíferos: humanos, equinos y bovinos (Hashimoto y col. 1979; Dubovi y Maclachlan 2010).

Tal como ocurre en otras especies de mamíferos, en los caninos el desenlace de la gestación depende de la etapa en la que se da la infección. La administración intravenosa experimental a hembras de caninos gestantes en el día 30 a 40 resultó en infecciones transplacentarias del feto, con presencia de muerte fetal, abortos, momificación, parto prematuro y parto de cachorros vivos y muertos. Una hembra se inoculó al día 30 de la gestación, provocando muerte fetal y momificación de algunos cachorros, mientras que tres cachorros permanecieron vivos y fueron extraídos mediante cesárea. Estos cachorros se mantuvieron clínicamente sanos durante los primeros 14 días, momento en el que se realizó eutanasia y el estudio post mortem correspondiente, en donde no

se observaron lesiones ni se logró el aislamiento viral a partir de los órganos (Hashimoto y col. 1983).

En otro estudio, donde se inocularon siete hembras entre los días 48 a 53 de gestación se logró el nacimiento (cesárea) de 31 cachorros vivos y 2 muertos. La mayoría de los cachorros vivos (n=26) se observaron débiles y murieron dentro de las dos semanas posteriores al nacimiento con signos de infecciones sistémicas por CHV-1. El resto (n=5) de los cachorros permanecieron clínicamente sanos sin lesiones aparentes en el estudio *post mortem*, ni aislamiento viral que pudiera indicar infección alguna con CHV-1 (Hashimoto y col. 1982).

Un hallazgo que se observó fue la aparición de cachorros no infectados (sin signos clínicos de infección ni aislamiento viral), en camadas en donde la mayoría de los cachorros se encontraban aparentemente infectados por el CHV-1. La razón de este hallazgo no pudo ser explicada por los autores. Sin embargo, ellos compararon la infección transplacentaria por otros miembros de la familia *Herpesviridae*, la cual tiende a variar con la etapa de la gestación y el grado de desarrollo placentario, dejando restringida la infección por CHV-1 a algunos fetos y en ciertos momentos en los cuales el feto está expuesto (Hashimoto y col. 1983).

Infección durante el periodo neonatal

Los cachorros recién nacidos pueden adquirir la infección *in utero* o cuando atraviesan el canal de parto, pero la ruta más común para la infección es a través de las secreciones oronasales de la hembra, por hermanos de camada infectados o por otros perros cercanos (Rootwelt y col. 2009; Greene 2012).

Appel y sus colaboradores en 1969 señalaron que los cachorros que se infectan después de las dos semanas se ven relativamente poco afectados por el virus y la infección generalmente se asocia con infecciones localizadas en las vías aéreas altas.

El periodo de incubación varía de 4 a 10 días, y la mayoría de los cachorros afectados tienen menos de tres semanas de edad cuando se presentan los signos clínicos de enfermedad. La mortalidad de la camada puede ser alta y alcanzar tasas cercanas al 100% (Decaro y col. 2008). Los signos clínicos que se pueden presentar son anorexia, pérdida de interés en mamar, dolor abdominal, vocalización, opistótonos, descarga nasal, estornudos y heces blandas. Sin embargo, algunos cachorros no muestran signos evidentes (Carmichael y col. 1965; Poulet y col. 2001; Rootwelt y col. 2009). Carmichael en 1970 resumió en un artículo que después de la inoculación oronasal en cachorros, el sitio primario para la replicación es el epitelio nasal y las tonsilas. Después de tres a cuatro días, el virus entra al torrente circulatorio, generando una viremia asociada a los leucocitos, probablemente debido a la fagocitosis de macrófagos. El virus se disemina a través de la sangre y se replica en el endotelio vascular que reviste pequeños vasos sanguíneos, llevando a vasculitis necrosante con hemorragias difusas secundarias en múltiples órganos, incluyendo riñones, glándulas adrenales, hígado, bazo y pulmones (Poulet y col. 2001, Wright y Cornwell 1968).

En un estudio realizado por Percy y sus colaboradores en 1968, donde se infectaron experimental y naturalmente cachorros con CHV-1, se demostró que el virus provoca focos de edema, degeneración neuronal e infiltración de

neutrófilos en la retina. Además, el encéfalo presentó meningoencefalitis no supurativa, debido a la diseminación desde el ganglio trigémino.

Hasta la tercera semana de vida, los cachorros neonatos son incapaces de la regulación de la temperatura corporal. La temperatura rectal normalmente se encuentra de 1 a 1.5°C debajo de la temperatura normal en perros adultos, lo cual es óptimo para la replicación viral (Greene 2012).

En un estudio realizado por Carmichael y sus colaboradores en 1969, se utilizaron cachorros, normalmente resistentes, de 4 a 8 semanas de edad, a los cuales se les disminuyó la temperatura corporal después de ser inoculados por vía intraperitoneal. Estos cachorros presentaron lesiones microscópicas y se logró el aislamiento viral de CHV-1 a partir de sus órganos, lo cual no se pudo conseguir en sus hermanos de camada inoculados intraperitonealmente, pero conservados a una temperatura normal. Además de tener una capacidad de termorregulación baja, los cachorros recién nacidos presentan un sistema inmune poco desarrollado que los hace incapaces de generar una respuesta febril e inflamatoria adecuada antes de las 6 semanas de edad (Day 2007). Por lo tanto, se ha sugerido que estos dos factores (baja capacidad de termorregulación y pobre desarrollo inmune) hacen a los cachorros altamente vulnerables a la infección por CHV-1 (Carmichael y col. 1969; Rootwelt y col. 2009; Carmichael 1970).

Los anticuerpos contra CHV-1 en el suero y calostro de hembras seropositivas reducen el riesgo de trastornos reproductivos y protegen a los cachorros de desarrollar infecciones sistémicas fatales (ocasionados por CHV-1) (Carmichael 1970; Poulet 2001). Los cachorros que son amamantados por hembras

seronegativas o con bajos títulos de anticuerpos pueden infectarse y padecer la enfermedad de forma fatal, mientras que los cachorros amamantados por hembras con títulos altos de anticuerpos se pueden infectar, pero no presentan signos clínicos y la infección se limita a la región orofaríngea (Carmichael 1970; Huxsoll y Hemelt 1970). Con la presencia de anticuerpos protectores en el suero de las hembras infectadas se ha observado que si se infectan naturalmente y paren cachorros enfermos, usualmente tendrán camadas sanas en las gestaciones subsecuentes (Huxsoll y Helmet 1970; Evermann y col. 2011).

Los cachorros que sobreviven a infecciones generalizadas con CHV-1 frecuentemente presentan lesiones residuales en el sistema nervioso central, ojos, pulmones y riñones (Percy y col. 1968; Percy y col. 1971) y pueden desarrollar signos neurológicos y ceguera cuando son adultos (Greene 2012; Percy y col. 1971).

Infección en adultos.

Infección en el tracto respiratorio.

El CHV-1 se ha asociado a la enfermedad respiratoria multifactorial llamada traqueobronquitis infecciosa, también conocida como “Tos de las perreras”. Appel y sus colaboradores en 1969 inocularon cachorros de 5 a 12 semanas de edad por vía oronasal con una cepa de CHV-1 y demostraron la replicación viral en el tejido epitelial del tracto respiratorio superior, provocando signos clínicos moderados de rinitis y faringitis. Los signos de la traqueobronquitis infecciosa se relacionan con una tos enérgica no productiva. Estos signos fueron investigados por Erles y sus colaboradores en el 2004 en un estudio longitudinal de dos años en un refugio canino. Se observó tos consistentemente y las muestras obtenidas

de fosas nasales y tráquea mostraron CHV-1, pero también otros agentes virales. Dentro de estos, se destacan: el virus de parainfluenza canina y *Bordetella bronchiseptica* (Erles y col. 2004; Evermann y col. 2011), mientras que el papel del CHV-1 como etiología de la traqueobronquitis infecciosa aún no está bien esclarecido y permanece en investigación constante (Evermann y col. 2011).

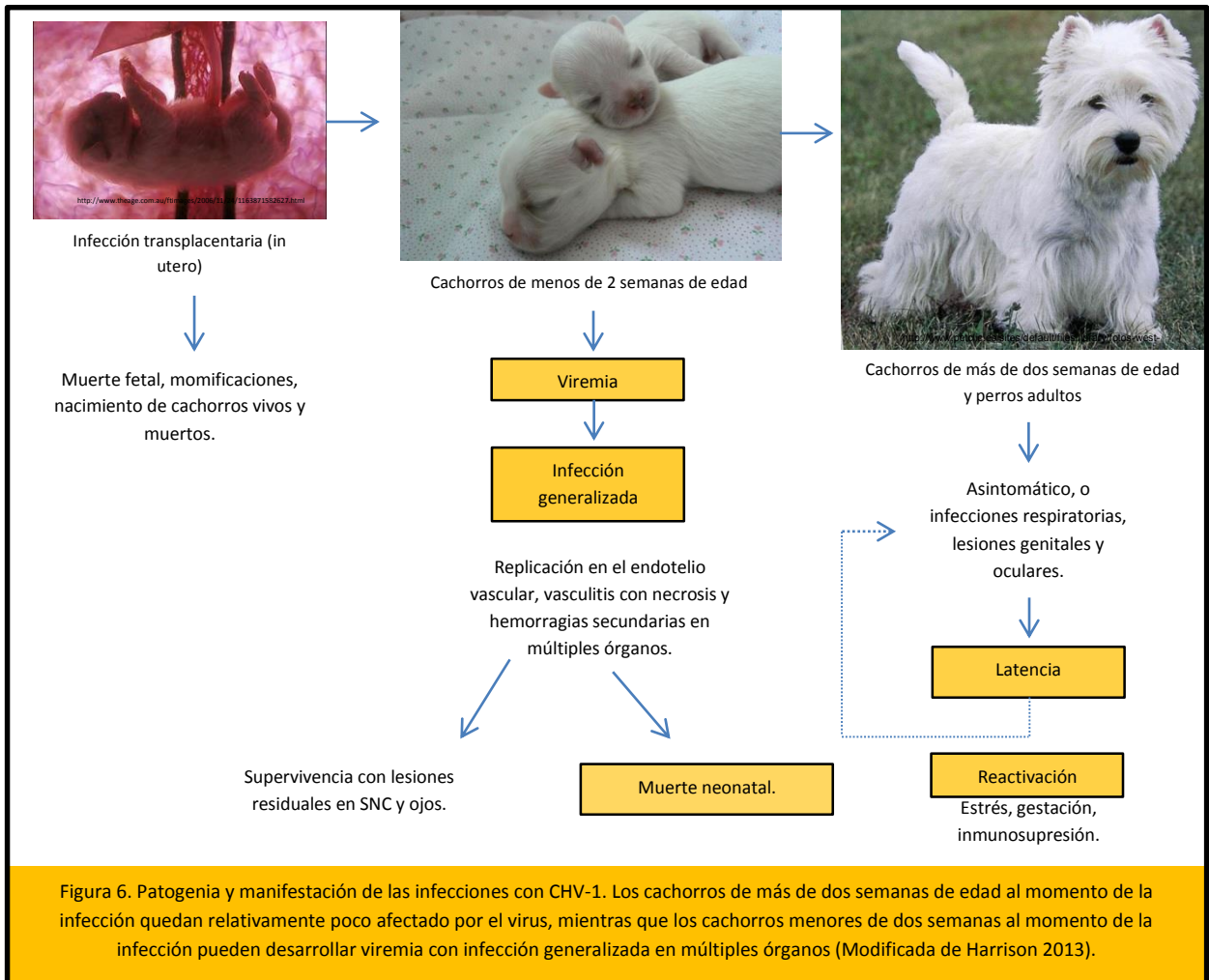
Lesiones genitales.

El CHV-1 se replica en temperaturas más frías, en la mucosa del tracto respiratorio superior y tracto genital. Se han reportado nodulaciones linfoides y hemorragias petequiales en el pene, prepucio y vagina, cuando se inocula experimentalmente al virus por vía intragenital (Hill y Maré 1974). Las lesiones genitales pueden ocasionar que el virus se transmita durante la cópula. Sin embargo, las lesiones genitales son un riesgo de transmisión aún más importante para cachorros durante el parto (Hill y Maré 1974; Rootwelt y col. 2009).

Lesiones oculares

La lesión en retina producida por el CHV-1 se ha demostrado en cachorros neonatos (Percy y col. 1968), en contraste, las lesiones oculares en perros adultos generalmente se restringen a la córnea, conjuntiva y párpado (Everman y col. 2011). Mediante una inoculación tópica ocular experimental de 8 caninos, Ledbetter y sus colaboradores indujeron, en 2009, conjuntivitis bilateral en todos los sujetos experimentales, seguido de latencia viral. Después de ocho meses, el virus se logró reactivar mediante la aplicación de prednisona, y las lesiones fueron caracterizadas por conjuntivitis y, en uno de los perros, por ulceración conjuntival superficial.

Las presentaciones clínicas se encuentran resumidas en la figura 6.



1.4 Latencia en el CHV-1

Una de las características típicas de los virus pertenecientes a la familia Herpesviridae es su habilidad para ocasionar infecciones latentes de por vida (Dubovi y Maclachlan 2010). Es una etapa de infección no productiva, reversible (Borchers y col. 1999; Gacek 2002). Durante la latencia, el ADN viral se encuentra en forma circular, no integrado, principalmente en el núcleo de las células nerviosas sensoriales (Borchers y col. 1999). Estimaciones calculan que tanto en humanos como en animales del 0.01 al 10% de las células ganglionares

pueden estar infectadas en forma latente, con 10 a 1000 copias del genoma viral por neurona (Borchers y col. 1999; Simmons y col. 1992; Cohrs y Gilden 2001).

Durante la latencia, la transcripción viral se restringe a los LATs (del inglés *latency associated transcripts*, transcritos asociados a latencia). La detección del ADN viral a través de la PCR no permite la diferenciación de virus infectantes o en latencia. Se necesita de RT-PCR (transcriptasa reversa- PCR) o de hibridación *in situ* para detectar los LATs y demostrar realmente la latencia (Borchers y col. 1999; Jones 1998; Ohmura y col. 1993; Townsend y col. 2004).

Para determinar las células afectadas y los sitios en donde se da la latencia por CHV-1, Miyoshi y sus colaboradores en 1999 inocularon experimentalmente a perros adultos, seronegativos, por vía intranasal (n=2), vía intranasal e intravenosa (n=3) o vía intravaginal (n=3) con CHV-1. Utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pudieron determinar el ADN viral en el ganglio trigémino, sin importar la vía de inoculación. Otro sitio importante de latencia viral fueron los linfonodos retrofaríngeos, detectándose en 7 de los 8 caninos. También se detectó ADN viral en el ganglio lumbosacro, pero solo en 4 de los 8 caninos (50%).

Burr y sus colaboradores en 1996 utilizaron la PCR para detectar CHV-1 en 12 sitios claves, que se consideran importantes para latencia en otros Herpesvirus. El DNA viral se detectó en 9 de 12 animales probados. Los tejidos que más comúnmente se afectaron fueron los ganglios lumbosacros, tonsilas, hígado y las glándulas salivales parótidas.

Los abortos y los mortinatos se pueden asociar con la localización viral en ganglios lumbosacros a la vía de transmisión del tracto reproductor o

transplacentario. Sin embargo, es más frecuente que se detecte en tejidos relacionados con la mucosa oronasal, lo que podría indicar que la ruta de transmisión más común es a partir de secreciones oronasales. Durante la latencia, aparentemente el CHV-1 se “esconde” en los tejidos linfoides y ganglionares de las mucosas oronasales y genitales, ya que en ninguno de los estudios mencionados se encontró ADN viral en la sangre (Burr y col. 1996; Miyoshi y col. 1999) (figura 7).



Reactivación y diseminación viral

La reactivación viral ocurre esporádicamente, asociada a estrés, gestación y a la administración de medicamentos inmunosupresores (Greene 2012). La reactivación de la latencia de CHV-1 se demostró en hembras tratadas con prednisolona con historial de trastornos reproductivos ocasionados por el virus. A las hembras se les administraron dosis altas de prednisolona (600mg) por cinco días consecutivos; se confirmó la reactivación en 4 de las 5 hembras

tratadas (Okuda y col. 1993). Los autores no observaron ningún signo clínico en las hembras, pero se logró obtener CHV-1 de las mucosas oral, nasal, vaginal y ocular desde una hasta tres semanas después del inicio del tratamiento (Okuda y col. 1993). La diseminación viral, posterior a la reactivación dura sólo unos pocos días, comparada con la diseminación que se daría a partir de una infección primaria la cual es prolongada y con altos títulos virales (Ronsse y col. 2005; Okuda y col. 1993).

La dificultad en la predicción de la reactivación y los patrones de anticuerpos se enfatiza en el estudio desarrollado por Ronsse y sus colaboradores en el 2005, en el que se dio seguimiento a 27 hembras reproductoras durante un ciclo reproductivo para la detección de ADN viral y de anticuerpos específicos. Todos los individuos serológicamente negativos seroconvirtieron durante el estudio. Sin embargo, el 40% de los individuos seropositivos se transformó en seronegativos una o dos veces en el tiempo que duró el trabajo. Además, se encontraron dos tipos de patrón de anticuerpos en hembras con fertilidad reducida y con trastornos reproductivos. Algunas hembras mostraron títulos positivos altos o moderados durante todo ciclo reproductivo, mientras que otras tuvieron decremento en los títulos de anticuerpos durante el diestro temprano y tardío (Ronsse y col. 2005). Cuando se compararon las medias de títulos de anticuerpos entre hembras apareadas, con y sin problemas reproductivos no se encontró diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, se observó una tendencia de aumento de títulos durante el estro y el inicio del diestro para las hembras que no presentaban problemas reproductivos (Ronsse y col. 2005). Esto podría indicar un aspecto de protección del suero de las hembras gestantes para la reducción del riesgo de trastornos reproductivos.

1.5 Diagnóstico.

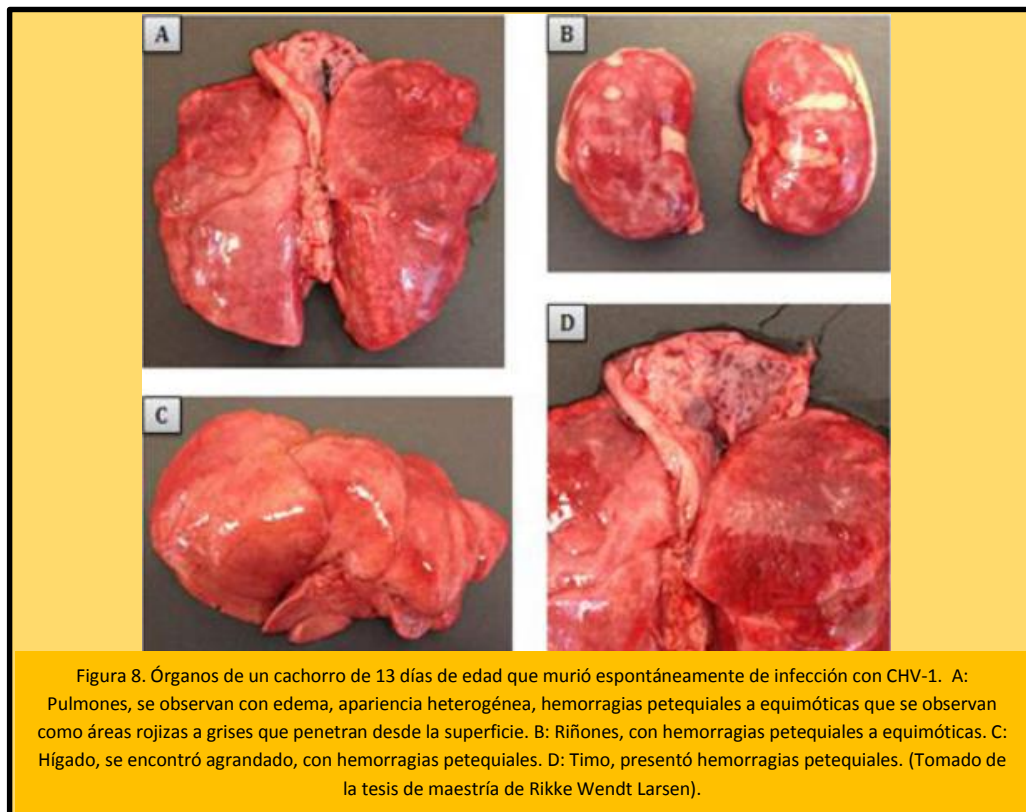
La información obtenida de la historia clínica de los cachorros, comparándola con la mortalidad elevada de la camada durante el periodo neonatal, usualmente hace sospechar al médico veterinario de una infección con CHV-1. Para confirmar el diagnóstico, se debe realizar en análisis patológico e histopatológico, así como la detección del ADN viral en los órganos de los cachorros muertos.

Hallazgos *postmortem*.

El examen *postmortem* es importante en el diagnóstico de CHV-1. La apariencia general de los cachorros frecuentemente es normal, algunas veces muestran baja de peso (Poulet y col. 2001). Las lesiones macroscópicas características incluyen hemorragias petequiales y equimóticas, así como agrandamiento de algunos órganos especialmente riñones, hígado, bazo e intestino delgado (Carmichael y col. 1965; Wright y Cornwell 1968; Poulet 2001). Una de las lesiones que se encuentra con mayor frecuencia son los riñones con apariencia heterogénea y moteada debido a una vasculitis y necrosis agudas, con hemorragias secundarias (McGavin y Zachary 2007; Kirsbride 2012). Los pulmones no se colapsan debido al edema. Además, las hemorragias petequiales y equimóticas se encuentran en forma difusa sobre la superficie, dando un aspecto de áreas grises y rojizas. Se observa agrandamiento de linfonodos (Carmichael 1965) con signos de meningoencefalitis hemorrágica difusa y lesiones en retina en cachorros infectados experimental o naturalmente (Percy y col. 1968).

Hallazgos histopatológicos.

Cuando se tiñen los cortes de tejido con hematoxilina y eosina (HE), los hallazgos histopatológicos de las infecciones naturales o experimentales en cachorros neonatos se caracterizan por focos diseminados de necrosis con hemorragias periféricas en los riñones, pulmones, bazo, intestino delgado y encéfalo (Carmichael y col. 1965; Love y Huxtable 1976; Poulet y col. 2001) (figura 8). Carmichael en 1965 reportó que se puede encontrar un infiltrado leucocitario leve, pero que en general, raramente se encuentra inflamación en las áreas de necrosis. La síntesis del ADN y las nucleocápsides se da dentro del núcleo del hospedero (Rootwelt y col. 2009). La replicación es rápida y altamente destructiva, da lugar a cuerpos de inclusión eosinófilos intranucleares en la periferia de los focos necróticos, lo cual es de valor diagnóstico (Greene 2012).



Detección de ADN viral.

La determinación e identificación de las infecciones por CHV-1 recaían anteriormente en el aislamiento viral a partir de tejidos o muestras obtenidas con hisopos, o en los estudios serológicos para determinar anticuerpos. El gran éxito de la PCR ha hecho de este método uno más común y sensible para la detección del ADN viral del genoma del CHV-1 y, especialmente, para la detección del virus en latencia (Burr y col. 1996; Decaro y col. 2010).

1.6 Seroprevalencia

El CHV-1 ha sido aislado en diversos países alrededor del mundo, y estudios recientes en Europa sugieren que es una enfermedad enzoótica en la población canina (Lacheretz y Cognard 1998; Reading y Field 1998; Rijsewijk y col. 1999; Ronsse y col. 2002).

El virus se considera pobremente inmunogénico, con anticuerpos neutralizantes que desaparecen tan solo unos pocos meses después de la infección (Carmichael y Greene 1998).

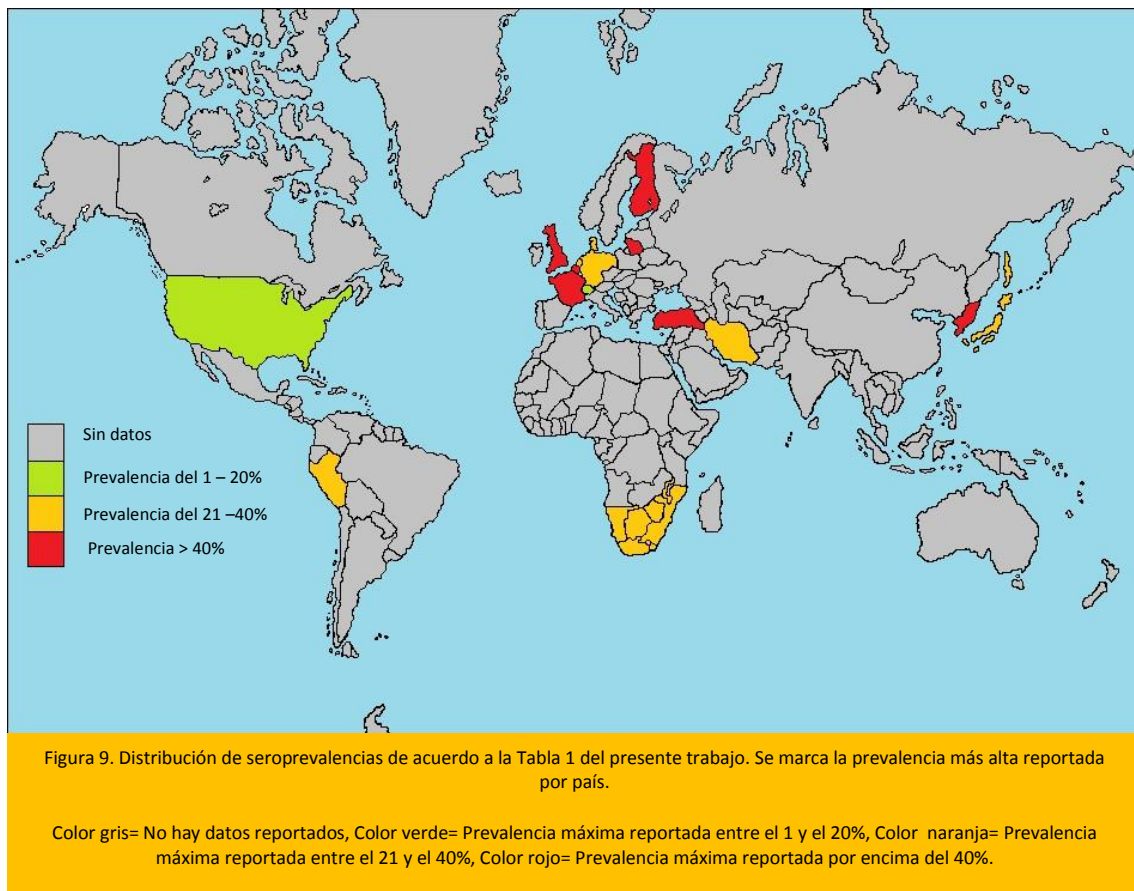
Los estudios más recientes estiman la seroprevalencia entre el 30 y 40% (Tabla 1, figura 9), observando una mayor prevalencia en caninos de criaderos; siendo el tamaño del criadero, la higiene y la presentación de la tos de las perreras factores de riesgo. Además, se ha establecido una relación entre la seroprevalencia y el historial de abortos y mortalidad neonatal (Guigal y col. 2002; Ronsse y col.2004).

Tabla 1 . Seroprevalencias encontradas en diferentes países alrededor del mundo.

Año	Referencia	País	Población	Seroprevalencia
1969	Lundgreen y Clapper 1969	USA	Muestreo aleatorio	12.8%
1974	Fulton <i>et al.</i> 1974	USA	Muestreo aleatorio	6%
1975	Bibrack y Schaudinn 1976	Alemania	1-Muestreo aleatorio 2-Caninos con problemas reproductivos	1-12% 2-39.1%
1977	Osterhaus <i>et al.</i> 1977	Holanda	1-Caninos particulares 2-Caninos con problemas reproductivos	1-2.8% 2-12%
1979	Delisle 1982	Francia	1-Caninos particulares 2-Caninos de criadero	1-0.5% 2-28.4%
1980	Engels <i>et al.</i> 1980	Suiza	Muestreo aleatorio	6.3%
1980	Schwens <i>et al.</i> 1980	Bélgica	Muestreo aleatorio	1%
1990	Takumi <i>et al.</i> 1990	Japón	Muestreo aleatorio	26.2%
1989-1991	Poulet y Dubourget 1993	Francia	Caninos de criadero	15.5%

Tabla 1 (continuación). Seroprevalencias encontradas en diferentes países alrededor del mundo.

Año	Referencia	País	Población	Seroprevalencia
1994	Seo <i>et al.</i> 1994	Corea	1-Caninos particulares	1-28%
			2-Caninos de criadero	2-58%
1997-1998	Rijsewijk <i>et al.</i> 1999	Holanda	Caninos particulares	39.3%
1998	Reading y Field 1998	Reino Unido	Caninos particulares	88%
1998	Lacheretz y Cognard 1998	Francia	Caninos con problemas reproductivos	43%
2000	Ronsse <i>et al.</i> 2002	Bélgica	Caninos con problemas reproductivos	46.1%
2000	Guigal <i>et al.</i> 2002	Francia	Caninos de criadero	30.6%
2001	Van Gucht <i>et al.</i> 2001	Bélgica	Caninos de criadero	49.5%
2005	Góngora 2005	Perú	Muestreo aleatorio	32%
2007	Dahlbom 2007	Finlandia	1-Caninos con problemas reproductivos	1-100%
			2-Caninos sin problemas reproductivos	2-65%
2008	Nöthling <i>et al.</i> 2008	Sudáfrica	Caninos de criadero	22%
2009	Engelbrecht 2009	Dinamarca	Población específica	26.4%
2009	Abuzer 2009	Turquía	Raza Kangal	71.8%
2010	Babaei 2010	Irán	1-Caninos particulares	1-19.1%
			2-Caninos de criadero	2-22.9%
2012	Yesilbag 2012	Turquía	Muestreo aleatorio	62.1%
2013	Musayeba 2013	Lituania	1-Caninos particulares	1-11%
			2-Caninos de criadero	2-85%



1.7 Tratamiento

En caninos adultos únicamente se utiliza tratamiento contra el problema respiratorio, ocular o las lesiones genitales; en la mayoría de los casos no hay necesidad de administrar tratamiento ya que es una enfermedad autolimitante (Evermann y col. 2011).

El tratamiento con dosis elevadas de medicamentos antivirales como el Aciclovir se recomienda en el caso del herpes neonatal humano, y presenta buenos resultados (Kimberlin y col. 2001). En el reporte de un caso clínico en California se describe el uso efectivo del Aciclovir en la terapia y mantenimiento de cachorros neonatos infectados con CHV-1 (Davidson y col. 2003). Sin embargo,

se han reportado signos de intoxicación debido a la ingestión accidental del Aciclovir a dosis de 40mg/kg (Richardson 2000). La farmacocinética, la biodisponibilidad y la dosis terapéutica efectiva para CHV-1 en perros se desconoce actualmente y se requieren mayores estudios antes de recomendarse su uso como tratamiento antiviral en los casos de herpesvirosis canina neonatal (Evermann y col. 2011).

La proteína blanco de las terapias antivirales, contra los alfa herpesvirus, recae en la ADN polimerasa; sin embargo, durante la latencia, el virus no expresa este gen por lo que las terapias convencionales no afectan a los virus en latencia (Field y col. 2006; Hussein y Field 2008).

La inyección intraperitoneal de 1 a 2 ml de suero inmune, obtenido de un perro con anticuerpos contra CHV-1, o una elevación en la temperatura corporal para reducir la replicación viral, aparentan reducir la mortalidad en aquellos cachorros que no presentan signos de una infección generalizada (Greene 2012). El tratamiento para los caninos neonatos con signos de infecciones generalizadas por CHV-1 es muy limitado y con un pronóstico pobre.

1.8 Vacunación y procedimientos profilácticos.

Existe una vacuna en Europa con licencia (Eurican® Herpes 205, Merial, Francia), la cual contiene una proteína de superficie específica (glicoproteína gB) de CHV-1 (EMEA 2002). Esta se administra por vía subcutánea a las hembras gestantes en un régimen de dos dosis, para asegurar un nivel elevado de anticuerpos neutralizantes al momento del parto. La primera vacunación se debe de hacer durante el estro o de 7 a 10 días después de la monta, la segunda vacuna se debe de aplicar de una a dos semanas antes del parto (EMEA 2002).

La vacunación provee inmunidad materna pasiva a los cachorros, cuando absorben las inmunoglobulinas G del calostro y la leche en las primeras 12-36 horas de vida (EMEA 2002).

Poulet y sus colaboradores demostraron, en el 2001, que la vacunación a las hembras gestantes protegía a los cachorros contra el CHV-1. Se desafiaron cachorros de hembras vacunadas y no vacunadas, por vía oronasal tres días después del nacimiento con una cepa virulenta de CHV-1. La mayoría de los cachorros de hembras no vacunadas murieron de una infección generalizada entre los 6 y los 14 días después del desafío. Ninguno de los cachorros de las hembras del grupo vacunado murió de la infección por CHV-1.

La vacunación se debe de suplementar con procedimientos profilácticos para reducir el riesgo de infección por CHV-1 en los cachorros neonatos. Ronsse y sus colaboradores en el 2004 estudiaron los factores que influyen los niveles de anticuerpos y, consecuentemente, el riesgo de la infección por CHV-1 en perros de criadero. Los principales factores de riesgo fueron el tamaño del criadero, la higiene y la tos de las perreras. Los criaderos con un gran número de perros (> 6 perros), y con higiene pobre, tuvieron niveles más elevados de anticuerpos. Además, los perros con historial de brotes de tos de las perreras en el criadero presentaron niveles significativamente más elevados de anticuerpos que los perros sin dicho historial (Ronsse y col. 2004).

Para proteger a los perros neonatos de la infección, una sugerencia de un régimen de profilaxis para criaderos grandes puede ser mejorar la higiene y aislar a las hembras con cachorros para disminuir el riesgo de la infección por CHV-1 de perros cercanos. Adicionalmente, las buenas condiciones ambientales que

aseguren una elevación en la condición corporal, pueden proteger a los cachorros no infectados (Carmichael 1970). Además, el consumo de calostro dentro de las primeras horas de vida es esencial para que los cachorros reciban anticuerpos maternos que los protejan de la infección.

2. JUSTIFICACIÓN

En México no existe ningún reporte del aislamiento del Herpesvirus canino, ni de su asociación con enfermedad en caninos del país. Además, la herpesvirosis presenta elevada mortalidad de los cachorros infectados, lo que representa grandes pérdidas económicas para los criadores de perros en el país, sin contar con opciones de diagnóstico, tratamiento o profilaxis.

3. HIPÓTESIS.

El Herpesvirus canino tipo 1 se encuentra infectando a la población de caninos de la zona cercana a la FES-C.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la presencia del Herpesvirus canino en el área metropolitana de la ciudad de México, mediante la detección, aislamiento e identificación del virus, así como la determinación de anticuerpos en caninos de criaderos de la zona de influencia de la FES-Cuautitlán.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

1-Evaluar las alteraciones patológicas en caninos de menos de 25 días de edad remitidos a necropsia y establecer la posible relación con el CHV-1.

2-Aislar al CHV-1 en cultivo celular e identificarlo mediante inmunofluorescencia, reacción en cadena de la polimerasa y microscopía electrónica.

3-Determinar la prevalencia de anticuerpos de la clase IgG contra CHV-1 en caninos de criaderos de la zona de influencia de la FES-C, mediante una prueba de ELISA comercial.

4-Comparar la técnica de ELISA comercial contra la técnica de seroneutralización por reducción en la formación de placas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

El estudio se realizó a partir del hallazgo de casos de caninos cachorros de menos de un mes de edad remitidos a necropsia, con lesiones macroscópicas y microscópicas sugestivas de CHV-1. Las lesiones macroscópicas más relevantes encontradas fueron hemorragias petequiales y equimóticas en pulmones, riñones, hígado e intestino, con múltiples focos de áreas grisáceas. Las alteraciones microscópicas relevantes consistieron en hemorragia multifocal en la corteza renal, hígado, en pulmones y en encéfalo, necrosis multifocal en riñones, intestino y pulmones, así como inflamación proliferativa en pulmón, bazo, riñón, hígado y encéfalo.

Partiendo de este punto se planteó realizar el diagnóstico definitivo para la infección por CHV-1, mediante inmunofluorescencia y PCR. Cabe destacar que durante el proceso se obtuvieron necropsias de cachorros de menos de un mes de edad a los que se sometió bajo el mismo criterio diagnóstico.

Inmunofluorescencia (IF).

Se utilizó inmunofluorescencia directa, la cual utiliza anticuerpos marcados con reactivos fluorescentes que van dirigidos contra el antígeno blanco. Una vez hecha la reacción, se expone a luz ultravioleta emitida por un microscopio de epifluorescencia (Odell y Cook 2013).

Para este trabajo se utilizó un conjugado policlonal anti CHV-1 comercial (VMRD, Inc, WA USA) y se siguió el procedimiento recomendado por el fabricante:

Las muestras de tejidos fueron incluidas en bloques de parafina, los cuales fueron sometidos a cortes (0.2 micras) y montados sobre el portaobjetos. El corte de

tejido fue desparafinado y se dejó secar durante 30 minutos a temperatura ambiente. La laminilla fue posteriormente fijada con acetona –metanol (75/25) a temperatura ambiente por 20 minutos.

La tinción se realizó adicionando 75 µl del conjugado (Antisuero anti-CHV1 policlonal conjugado a Isotiocianato de fluoresceína marca VMRD) por 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.

La laminilla con el corte del tejido se enjuagó gentilmente en Buffer de enjuague, pH 9.0 (Na₂HPO₄ 0.119%, NaH₂PO₄ 0.022%, NaCl 8.55%). Se eliminó el exceso de líquido de la laminilla.

Finalmente se adicionó medio de montaje FA (Glicerol/Buffer de enjuague, pH9.0, 1:1) y se realizó la observación microscópica en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss).

Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la síntesis específica y exponencial de una región predeterminada de ADN por medio del uso de dos pequeños fragmentos de ADN específicamente diseñados (iniciadores, cebadores, primers u oligonucleótidos) (Van Pelt-Verkuil y col. 2008).

Para tener una muestra de ADN, tiene que ser extraído y separado de todo el material celular y tisular. En el presente trabajo se utilizó un Kit comercial de extracción de ADN a partir de tejido (DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante:

-Se cortaron fragmentos de aproximadamente 0.5 cm cuadrados de los tejidos de las necropsias de los cachorros sospechosos de haber muerto por

herpesvirosis canina, los cuales se introdujeron en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y se les adicionaron 180 µl del buffer ATL y 20 µl de la proteinasa K. Se realizó una mezcla y se incubó a 56°C hasta que se obtuvo una lisis completa (aproximadamente 2 horas) y se mezcló nuevamente.

-Se adicionaron 200 µl del buffer AL y se mezcló completamente mediante vórtex, se adicionaron 200 µl de etanol al 96%, mezclando completamente.

-El líquido se transfirió a las columnas del kit, misma que se colocó en un tubo de colección de 2 ml y se centrifugó por 1 minuto a 6,000 x g.

-La columna se cambió a un tubo de 2 ml y se le agregaron 500 µl del buffer AW1. Se centrifugó a 6,000 x g por 1 minuto.

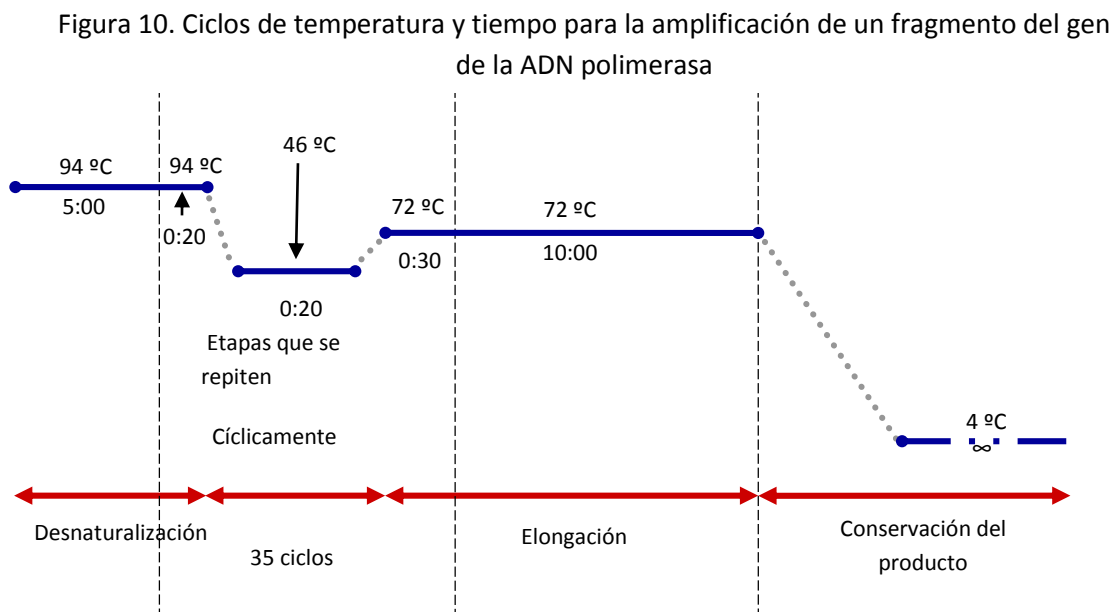
-La columna se cambió a un tubo de 2 ml y se le agregaron 500 µl del buffer AW2. Se centrifugó a 20,000 x g por 3 minutos.

-Se transfirió la columna a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se le adicionaron 200 µl del buffer AE de dilución, se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó por un minuto a 6,000 x g. El extracto de ADN se congeló a -20°C hasta su uso.

Para determinar la presencia del ADN de Herpesvirus en las muestras de tejido se utilizó un protocolo descrito por VanDeVanter y sus colaboradores en 1996, dirigido a amplificar un fragmento del gen de la ADN polimerasa viral, a través de oligonucleótidos degenerados. Es específico para la familia *Herpesviridae*, amplificando fragmentos de 215 a 315 pb. Se realizó una PCR anidada con dos oligonucleótidos sentido y uno contrasentido en la primer reacción (DFA-5'- GAY TTY GCI AGY YTI TAY CC -3' (sentido), ILK-5'-TCC TGG ACA AGC AGC ARI

YSG CIM TIA A -3' (sentido), KG1-5'- GTC TTG CTC ACC AGI TCI ACI CCY TT -3' (contrasentido)). Mientras que en la segunda reacción se utilizan uno sentido TGV-5'- TGT AAC TCG GTG TAY GGI TTY ACI GGI GT -3', y uno contrasentido IYG-5'- CAC AGA GTC CGT RTC ICC RTA IAT -3' (Tabla 2).

Para la primera reacción se utilizaron 400 ng de ADN como muestra, con una mezcla de PCR compuesta por 400nM de cada oligonucleótido, 100µM de cada dNTP, 10mM de KCl, 10 mM (NH₄)₂ SO₄, 20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100 at pH 8.8 y 1 unidad de Taq polimerasa (Bioline, USA). Se utilizó un termociclador Multigene (Labnet internacional), con las condiciones de ciclado de incubación inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 46°C por 30 segundos, y 72°C por 30 segundos. Se dio un paso final de 10 minutos a 72°C (Figura 10). Para la segunda reacción de PCR anidada se utilizaron las mismas concentraciones, pero utilizando 5µl de la primera reacción como templado de ADN.



Para evidenciar el amplificado se realizó una electroforesis horizontal con un gel de agarosa al 3% conteniendo 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, y se visualizó en un transiluminador de luz UV.

Tabla 2. Condiciones del proceso de reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación de un fragmento del gen de la ADN polimerasa.

Iniciadores utilizados		Fragmento esperado	Condiciones de termociclado		
Primera reacción de la PCR anidada	DFA-5'- GAY TTY GCI AGY YTI TAY CC -3'	215 a 315 kpb	94°C	5 minutos	55 ciclos
	ILK-5'-TCC TGG ACA AGC AGC ARI YSG CIM TIA A -3'		94°C	20 segundos	
	KG1-5'- GTC TTG CTC ACC AGI TCI ACI CCY TT -3'		46°C	20 segundos	
Segunda reacción de la PCR anidada	TGV-5'- TGT AAC TCG GTG TAY GGI TTY ACI GGI GT -3'		72°C	20 segundos	
	IYG-5'- CAC AGA GTC CGT RTC ICC RTA IAT -3'		72°C	10 minutos	

Aislamiento viral en células MDCK.

Una vez confirmado el diagnóstico por estas IF y PCR, se procedió a realizar el aislamiento viral en células MDCK (de riñón de perro), para lo cual se utilizaron los tejidos de los caninos que se guardaron en congelación (Encéfalo, hígado, pulmón, riñón y bazo).

-Se cortaron en fragmentos de 0.5 cm³ y se maceraron con ayuda de un mortero y PBS estéril frío. Posteriormente el macerado se pasó por un homogeneizador de vidrio para lisar completamente la muestra. Se resuspendió en PBS estéril frío, para obtener una suspensión al 10% y se centrifugó dos veces a 1,500 rpm

por 15 minutos, obteniendo el sobrenadante, con el fin de eliminar los detritus grandes.

-El sobrenadante se filtró con membranas millipore™ de 0.22µm de diámetro poro para evitar la contaminación bacteriana y se inocularon 0.5 ml en cajas de 24 pozos Nunc con monocapa de células MDCK.

-Se dejó adsorber el virus durante 1 hora a 34-35°C, posteriormente, se adicionaron 1.5 ml de medio esencial mínimo (MEM) adicionado con 2% de suero de ternero neonato y se dejó en incubación a 34-35°C durante 5 días, con observación diaria de efectos citopáticos y citolíticos.

Para confirmar la identidad viral, se realizaron las técnicas de inmunofluorescencia directa, PCR y microscopía electrónica de transmisión (MET).

Inmunofluorescencia sobre cultivo celular.

Para la inmunofluorescencia directa sobre cultivo celular se realizó el siguiente protocolo:

-Las células se cultivaron sobre laminillas (Cell culture coverslip, sterile, Thermanox Plastic 13mm diámetro, marca NUNC). Posteriormente, se infectaron con los aislados virales y se incubaron durante 48-72 horas a temperatura de 34-35°C.

-Después de la incubación, las laminillas se retiraron y se adhirieron a un portaobjetos con resina, dejando hacia arriba la cara de la laminilla que contenía las células infectadas.

-Las laminillas se enjuagaron con solución amortiguada de fosfatos (PBS), con un pH de 7.2, y se fijaron con acetona durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se dejaron secar 10 minutos a 37°C en ambiente seco.

-La tinción fue realizada adicionando 75 µl del conjugado (Antisuero anti-CHV1 policlonal conjugado a Isotiocianato de fluoresceína marca VMRD) por 30 minutos a 37°C, en cámara húmeda.

-La laminilla con las células se enjuagó con Buffer de enjuague, pH 9.0 (Na₂HPO₄ 0.119%, NaH₂PO₄ 0.022%, NaCl 8.55%). Se eliminó el exceso de líquido de la laminilla.

-Finalmente, se adicionó medio de montaje FA (Glicerol/Buffer de enjuague, pH9.0, 1:1) y se realizó la observación microscópica en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss). Se obtuvieron fotografías para su posterior análisis.

Reacción en cadena de la polimerasa PCR

En esta sección del trabajo se utilizaron dos protocolos de PCR, uno dirigido a amplificar un fragmento del gen de la ADN polimerasa viral (Van de Vanter 1996), y otro dirigido a amplificar un fragmento del gen de la gB (Burr y col. 1996).

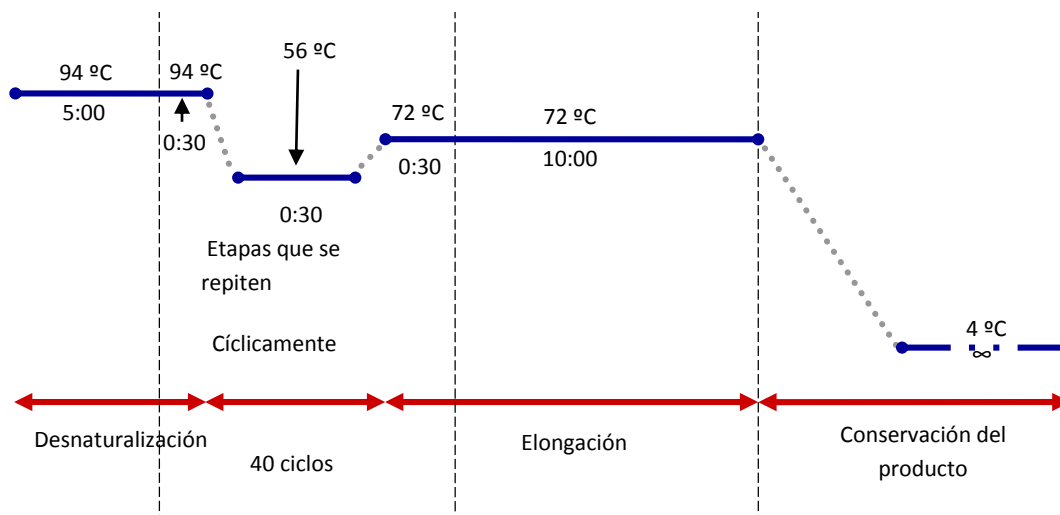
La extracción de ADN fue realizada con un protocolo similar al descrito con anterioridad para tejido, con el kit de extracción de marca Qiagen, con la variación del tiempo de lisis, siendo éste de 10 minutos.

El protocolo para la PCR anidada que amplifica un fragmento del gen de la ADN polimerasa viral se realizó de la misma forma que se describió anteriormente.

El protocolo de la PCR descrito por Burr y sus colaboradores en 1996 que amplifica un fragmento del gen de la gB del CHV-1, esperando un amplificado de 120 pb. Para este protocolo se utiliza un oligonucleótido sentido y uno contrasentido (P1: 5' CAG GAC TAT TGG ACT ATA GT 3' (sentido), P2: 5' TTG CAA TGC CCC TCA TAA TT 3' (contrasentido)).

Se utilizaron aproximadamente 400 ng de ADN como muestra, con una mezcla de PCR compuesta por 1 mM de cada oligonucleótido, 200 μ M de cada dNTP, 10 mM de KCl, 10 mM (NH₄)₂ SO₄, 20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100 at pH 8.8 y 1 unidad de Taq polimerasa (Bioline, USA). Se utilizó un termociclador Multigene (Labnet internacional), con las condiciones de ciclado de incubación inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, y 72°C por 30 segundos. Se dio un paso final de 10 minutos a 72°C (Figura 11).

Figura 11. Ciclos de temperatura y tiempo para la amplificación de un fragmento del gen de la glicoproteína B



Para evidenciar el amplificado se corrió en electroforesis horizontal con un gel de agarosa al 3% conteniendo 0.5µg/ml de bromuro de etidio, y se visualizó en un transiluminador de luz UV.

Microscopía electrónica de transmisión (MET).

La MET fue realizada en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, en el laboratorio de microscopía electrónica, con apoyo de la Maestra Sofía González Gallardo.

Tinción negativa de sobrenadantes de cultivo celular

-Los sobrenadantes de cultivo de células infectadas se fijaron con Karnosky y posteriormente se depositó una gota sobre papel parafilm.

-Se colocaron sobre la gota 2 rejillas de cobre de 200 MES marca STI con membrana durante 20 minutos.

-Después se tomaron las rejillas y se les retiró el exceso de fijador con papel filtro, se depositaron en una gota de agua destilada y por último, en una gota de ácido fosfotúngstico (AFT solución al 1% con pH de 7.2) durante un minuto. A las rejillas se les retiró el exceso de colorante con papel filtro.

-Las muestras fueron secadas a temperatura ambiente, observadas y fotografiadas en el microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM 100S).

-Se tomaron fotografías de un estándar de tamaño de partícula de 60 nm (Sigma®) como referencia para describir las estructuras observadas en las muestras.

Estudio Serológico.

Paralelo al aislamiento viral, surgió la pregunta de qué tan diseminado se encuentra la enfermedad, partiendo de que no existe ningún reporte en México de la presencia del virus en el país, ni existe evidencia serológica relacionada. Para lo cual se diseñó un muestreo serológico en criaderos cercanos a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Para obtener el número de muestra se utilizó la siguiente fórmula estadística, utilizando la probabilidad de éxito en 0.5, ya que se desconoce la prevalencia en el país:

$$n = \frac{Z^2 \alpha/2 pq}{e^2}$$

Dónde:

$1 - \alpha$: Nivel de confianza (95%)

$Z \alpha/2$: Valor de Z que delimita un área $\alpha/2$ a la derecha de la distribución normal estándar. (1.96, con un 95% de nivel de confianza)

e: Error máximo de estimación (0.1)

p: probabilidad de éxito (Serológicamente positivo, se desconoce, 0.5)

q: $1 - p$

Se obtuvo un número de tamaño de muestra adecuado de **96.04** individuos, por lo que se decidió cerrar el número a 100 individuos.

Los criterios de inclusión se determinaron de la siguiente forma, caninos habitando en criaderos, mayores de 1 año de edad y menores de 7 años y clínicamente sanos al momento del muestreo.

Se obtuvieron al menos 2 ml de sangre venosa de la vena safena o yugular, de acuerdo al tamaño del individuo con ayuda del sistema Vacutainer™ en tubos sin anticoagulante para la obtención de suero. La sangre, una vez coagulada, se centrifugó a 3,500 rpm en una centrifuga clínica con el fin de separar el suero del paquete celular. El suero se distribuyó en alicuotas en microtubos de 1.8ml marca Eppendorf™ para su inmediata congelación a -70°C hasta su uso.

Durante el muestreo se realizó una encuesta que incluía algunos datos del propietario y del criadero, edad, peso, talla, raza, etc. Así como historial de enfermedades oculares, cutáneas, de traqueobronquitis infecciosa y reproductivas (presentaciones clínicas de herpesvirosis canina).

Técnica de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Para detectar la presencia de anticuerpos contra CHV-1 se utilizó un kit comercial de ELISA marca EVL (Woerden, Holanda), el cual utiliza la partícula viral completa como antígeno.

Las muestras se procesaron de acuerdo a las recomendaciones del Dr Ir J R Van Herwijnen de la empresa EVL, bajo el siguiente protocolo:

-Se lavaron los pozos de las microplacas a usar mediante la adición de 250 µl de solución de lavado a cada pozo y su vaciado mediante inversión, por cinco veces. Al finalizar los 5 lavados se dejó la placa sobre papel absorbente para eliminar el exceso de líquido.

-Se realizaron diluciones 1:30, 1:90, 1:270 y 1:810 de los controles positivo y negativo, así como dilución 1:250 de los sueros problema, y se adicionaron 100 µl de cada una de las diluciones a un pozo recién lavado. Se selló la placa y se incubó durante 60 minutos a 37°C.

-Se lavó la placa de la misma forma en que se realizó en el primer punto y se dejó secar sobre papel absorbente.

-Se adicionaron 100 µl de los anticuerpos anti-canino conjugados con peroxidasa de rábano (HRPO) a cada uno de los pozos. Se selló la placa y se incubó durante 60 minutos a 37°C.

-Se lavó la placa de la misma forma en que se realizó en el primer punto y se dejó secar sobre papel absorbente.

-Se mezclaron partes iguales de los Buffer A y B (Solución generadora de color a base de tetrametilbencidina (TMB)) mediante pipeteo suave y se dispensaron 100 µl a cada uno de los pozos. Se incubó durante 18 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

-Se adicionaron 50 µl de la solución de paro a cada pozo y se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro con una agitación previa de 5 segundos.

Con los resultados de absorbancia se realizó el cálculo del título (título calculado) de cada una de las muestras, de acuerdo a las recomendaciones del Dr Ir J R Van Herwijnen. El cálculo de dicho título se basa en el supuesto que el control positivo presenta un título de 3600.

Seroneutralización.

Paralelamente, se detectaron los anticuerpos neutralizantes en 20 de las muestras serológicas, las cuales fueron seleccionadas aleatoriamente. Sin embargo, para realizar dicha determinación, se enfrentaron algunos problemas; se requería de un abasto viral suficiente para todas las pruebas, además el herpesvirus canino, así como los miembros del género *Varicellovirus*, presentan una alta dependencia a la célula, por lo que sus efectos citolíticos son pobres.

Para resolver dichos problemas, se realizaron dos pases de los aislamientos virales en embrión de pollo, mediante inoculación en membrana corioalantoidea, una técnica ampliamente usada para la replicación de otras especies de herpesvirus tipo alfa, como HSV-1, HSV-2, HSV-3, VZV, virus de laringotraqueítis infecciosa, virus de la pseudorrabia, etc (Akter y col. 2013). No existen reportes de la replicación de herpesvirus canino en embrión de pollo, sin embargo la Dra. Laura Cobos, asesora de este trabajo, la realizó con la muestra que fue proporcionada.

Para el ensayo de neutralización viral de herpesvirus canino, así como del virus de Varicela-Zoster (perteneciente al mismo género viral), se ha utilizado principalmente la técnica de neutralización por reducción del número de placas (Gerna y Chambers 1976; Engels y col. 1980; Takumi y col. 1989; Xuan y col. 1990; Nöthling y col. 2008;).

Para el presente trabajo se utilizó el protocolo descrito por Gerna y Chambers en 1976, en donde se combina la prueba de neutralización por reducción del número de placas, con la técnica de inmunoperoxidasa. Lo anterior se realizó debido al bajo efecto citopático que presentan las cepas de CHV-1 aisladas; ya que, como

los miembros del género varicellovirus, son virus estrictamente asociados a la célula.

Para la inoculación de los embriones se siguió la metodología que se describe a continuación (Barrón 2007):

-Se marcó la cámara de aire y el sitio de inoculación sobre el primer tercio del huevo en una zona con desarrollo vascular, en huevos embrionados de aproximadamente 9 días.

-Se desinfectaron los sitios marcados (cámara de aire y punto de inoculación) con una solución de Yodo y alcohol.

-Se perforó el cascarón y la membrana con ayuda de una aguja de calibre 18G, sin penetrar la membrana en el sitio de inoculación.

-Con ayuda del ovoscopio se realizó una falsa cámara de aire en el sitio de inoculación, succionando ligeramente sobre el orificio en la cámara de aire y manteniendo el huevo en posición horizontal, con el sitio de inoculación hacia arriba.

-En el sitio de formación de falsa cámara de aire se introdujo ligeramente la aguja de a jeringa y se depositaron 0.2ml de inóculo.

-Se realizó el sellado de los orificios con parafina y se dejó incubar a los embriones durante 5 días.

-El quinto día de incubación se sacaron los huevos de la incubadora y se dejaron en refrigeración durante toda la noche.

-Al siguiente día se rompió el huevo, por el extremo agudo y se descartó el contenido, permaneciendo con la membrana corioalantoidea, la cual se expuso sobre una caja de Petri para observar las lesiones pustulares.

-Dichas lesiones se recolectaron, maceraron y re suspendieron en 10 veces el volumen de PBS.

- La muestra se centrifugó para eliminar los detritus celulares grandes y se filtró con membrana millipore (0.2 micrometros).

Cuando se contó con la muestra obtenida a partir de embrión de pollo, se procedió a titular las partículas virales

La metodología realizada fue la siguiente:

-Las partículas virales fueron contabilizadas mediante la titulación por medio de formación de placas, para lo cual se realizaron diluciones decimales del aislamiento viral (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) y se adicionaron 0.5 ml en cada uno de los pozos de una placa marca NUNC de 12 pozos, conteniendo una monocapa de células MDCK confluyente. Se permitió la adsorción viral durante una hora a 35°C, redistribuyendo el inóculo cada 15 minutos y posteriormente se agregó lentamente medio MEM con 0.6% de agarosa y 1% de suero de ternero neonato a 45°C permitiendo la solidificación del mismo.

-Se incubó la placa a 35°C durante tres días, después de los cuales se agregó una gota de formol (43%) a cada uno de los pozos, lo que permitió retirar la capa de agarosa al siguiente día.

-Los pozos fueron lavados cuidadosamente con PBS y se fijaron con acetona/metanol durante 10 minutos. Posteriormente, se adicionaron a cada

pozo 0.5 ml de una dilución 1:80 del suero control positivo contra herpesvirus canino (EVL) y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Los pozos se lavaron tres veces con PBS y se les adicionó una solución de conjugado peroxidado anti IgG canino (Sigma Aldrich) a una dilución de 1:200 y se permitió su actividad durante 30 minutos a 37°C. Finalmente se lavaron tres veces los pozos con PBS y se adicionó una solución de diaminobencidina con 0.01% de peróxido de hidrógeno que permaneció durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de repetir el lavado con PBS y realizar una tinción contrastante con Hematoxilina de Harris por 15 segundos. Posteriormente se contabilizaron las placas (en los pozos en donde se obtengan de 20 a 100 placas), para obtener el título en unidades formadoras de placas (UFP) mediante la siguiente fórmula $UFP/ml = \text{Número de placas} \times \text{inverso de dilución} \times 1/0.5$.

El ensayo de neutralización fue realizado incubando, por 30 minutos a 37°C, cantidades iguales del virus (50 UFP) con diluciones de los sueros problema (1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64) previamente tratado por 30 minutos a 56°C para inactivar el complemento endógeno.

-Se inocularon 0.5 ml de la mezcla suero-virus a pozos de placas de 12 pozos marca NUNC y se permitió la adsorción viral durante una hora a 35°C, redistribuyendo el inóculo cada 15 minutos y posteriormente se agregó lentamente medio MEM con 0.6% de agarosa y 1% de suero de ternero neonato a 45°C permitiendo la solidificación del mismo.

Se incubó la placa a 35°C durante tres días, después de los cuales se agregó una gota de formol al 40% a cada uno de los pozos, lo que permitió retirar la capa de agarosa al siguiente día y se realizó el tratamiento de la placa de igual

forma que en el punto anterior. Se consideró el título final al inverso de la máxima dilución donde se obtuviera una reducción de al menos 50% del número de placas. Se consideró un suero negativo si a la dilución 1:8 del suero no presentaba una disminución del 50% o más en la formación de placas.

7. RESULTADOS.

De los tres casos de caninos de menos de tres semanas de edad (identificados como CHV-1 FESC 1, 2 y 3), los tres presentaron anorexia, pérdida de interés en mamar, dolor abdominal, vocalización, opistótonos, descarga nasal, estornudos y heces blandas, mientras uno de ellos mostró infección ocular purulenta. De los tres casos, toda la camada murió con signología similar, o murieron espontáneamente.

Necropsia. Hallazgos macroscópicos.

De los tres casos, en únicamente dos se logró realizar la necropsia, ya que en el tercero se observaban avanzados cambios post mortem.

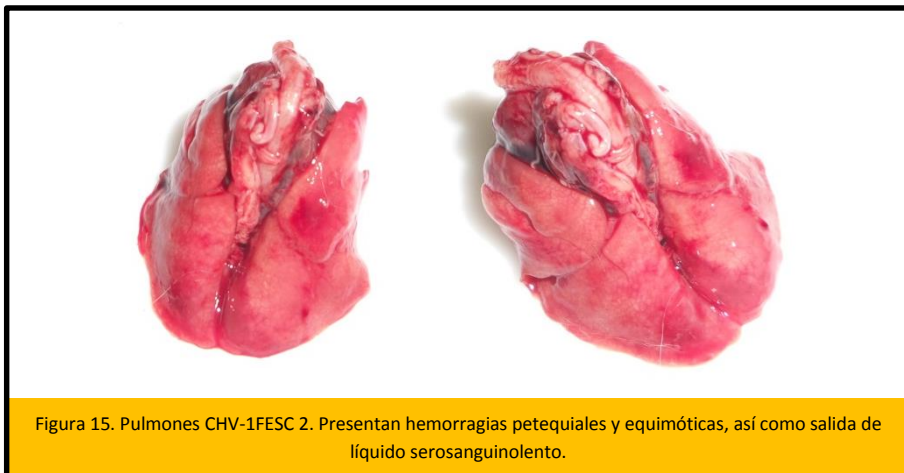
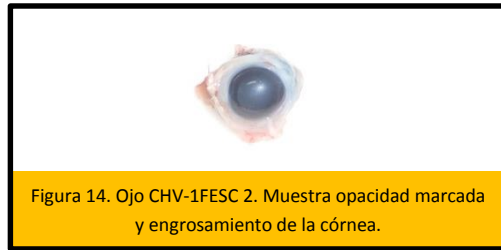
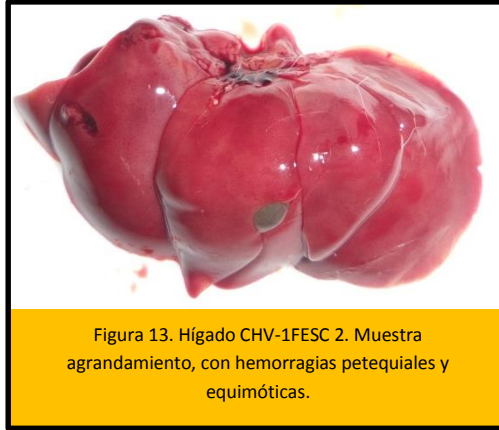
Durante la inspección externa e incisión primaria se observó una moderada opacidad y engrosamiento de la córnea (Figura 14).

Después de realizar la incisión secundaria se observó una escasa cantidad de líquido serosanguinolento en cavidad abdominal, así como notorio aumento de tamaño del hígado (Figura 12).

El hígado presentó pequeños focos de hemorragia petequiral y equimótica, así como salida de abundante cantidad de sangre al corte (Figura 13).

Los pulmones mostraron salida de líquido serosanguinolento al corte, así como zonas de hemorragia petequiral y equimótica (Figura 15).

Los vasos sanguíneos del encéfalo se observaron congestionados (Figura 16), mientras que los riñones mostraron las lesiones clásicas hemorrágicas, tanto petequirales como equimóticas (Figura 17).



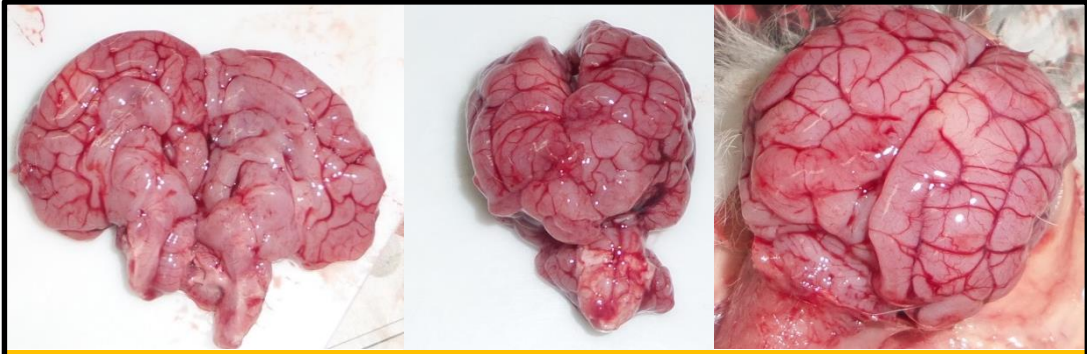


Figura 16. Encéfalo CHV-1FESC 2. Muestra severa congestión del parénquima y meninges.

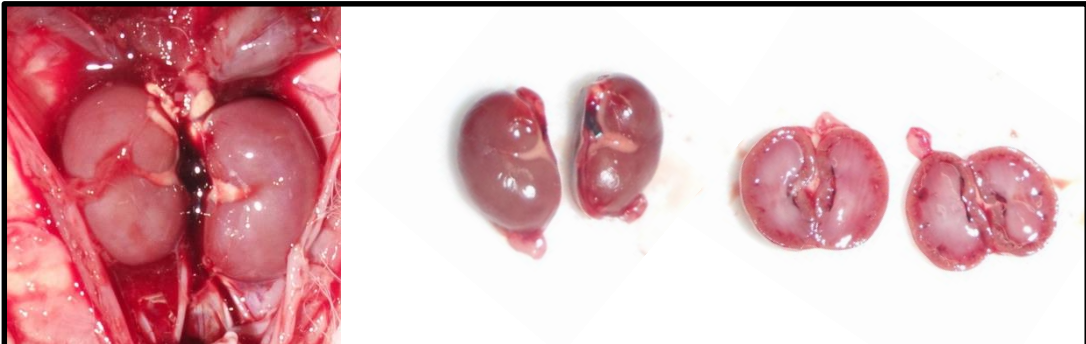
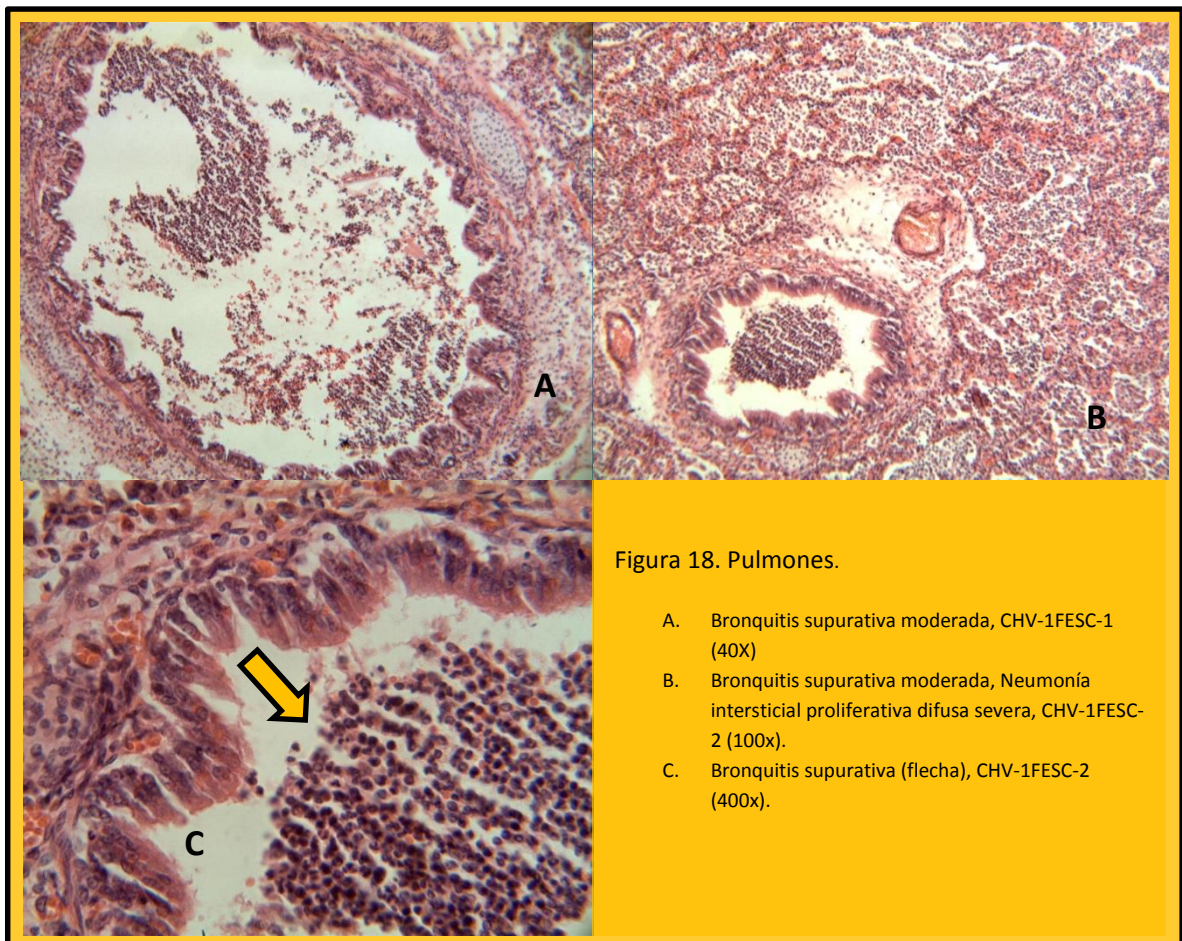


Figura 17. Riñones CHV-1FESC 2. Presentan hemorragias equimóticas y petequiales.

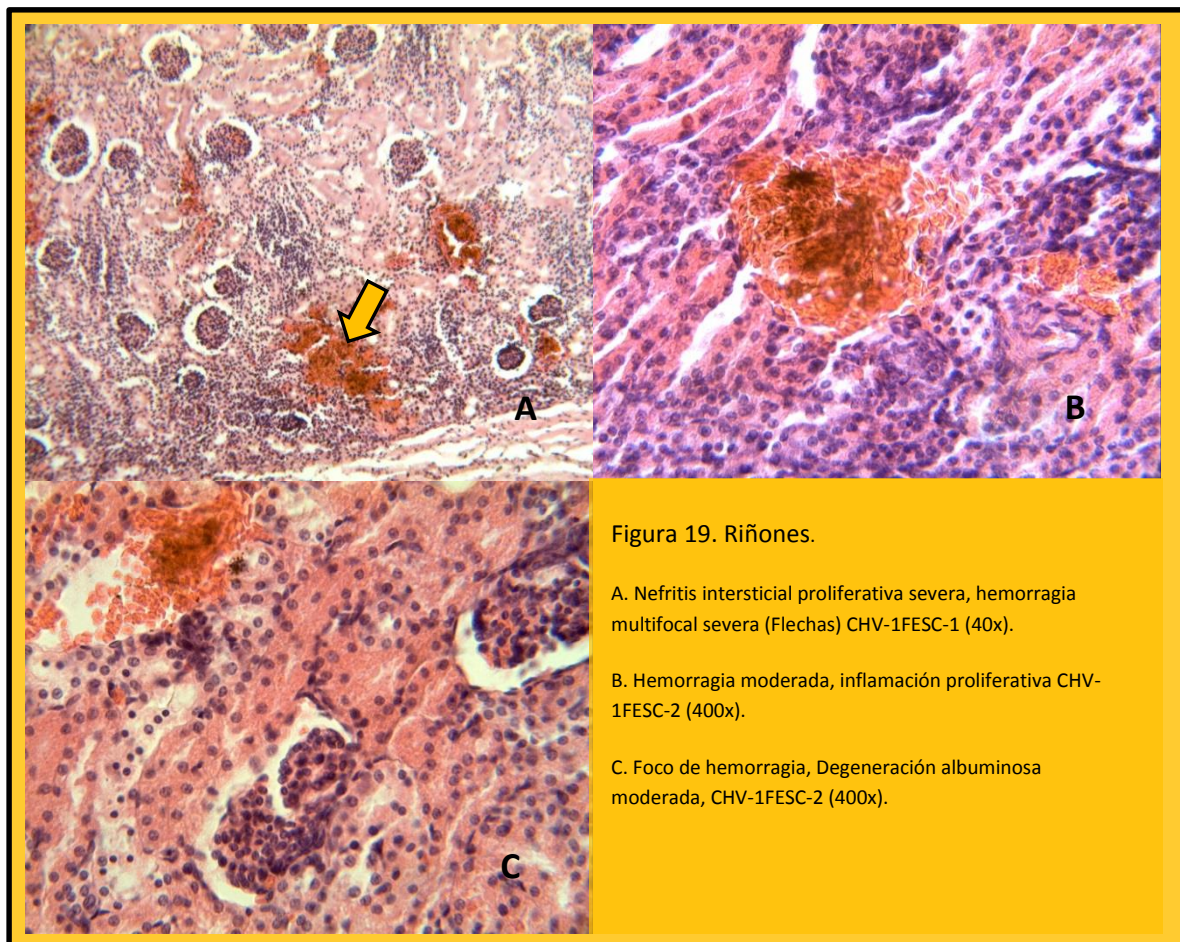
Necropsia. Hallazgos histopatológicos.

Se realizó la histopatología de los tejidos extraídos, encontrándose marcadas alteraciones, principalmente:

-Pulmones (figura 18): hemorragia multifocal moderada, neumonía intersticial proliferativa difusa moderada a severa, bronquitis supurativa multifocal moderada, edema multifocal moderado.



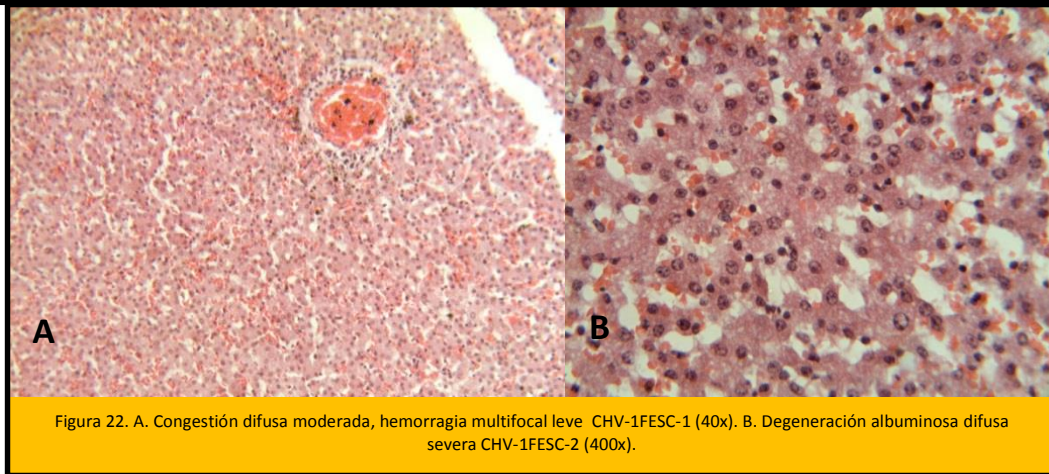
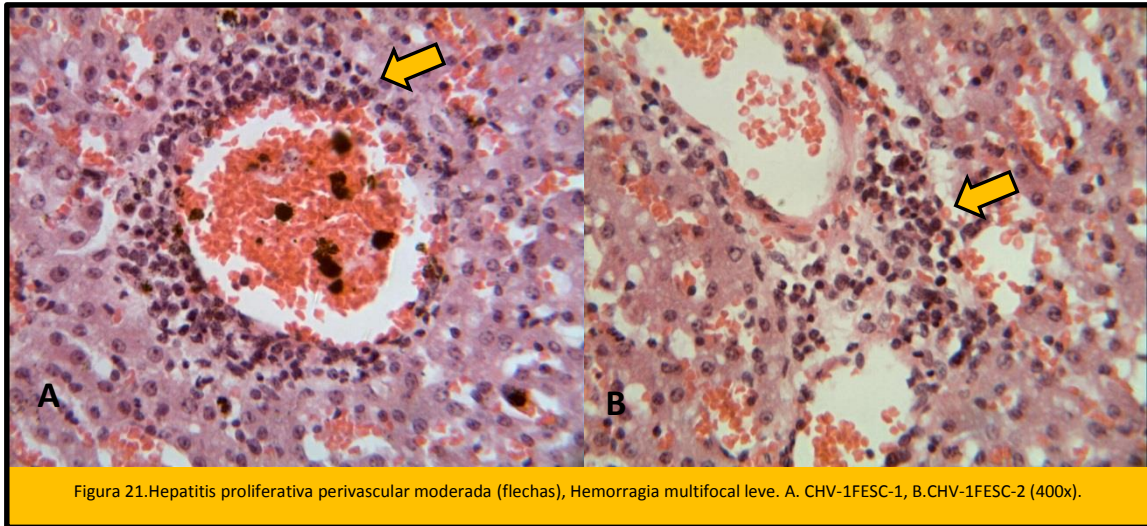
-Riñones (figura 19): congestión difusa moderada, degeneración albuminosa difusa severa, degeneración vacuolar multifocal moderada, hemorragia multifocal moderada con infiltrado linfocitario moderado, nefritis intersticial proliferativa moderada, necrosis multifocal moderada.



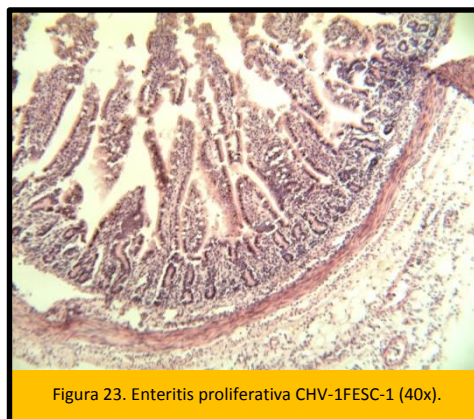
-Bazo (figura 20): hiperplasia linfoide moderada, congestión difusa moderada, hemorragia multifocal leve.



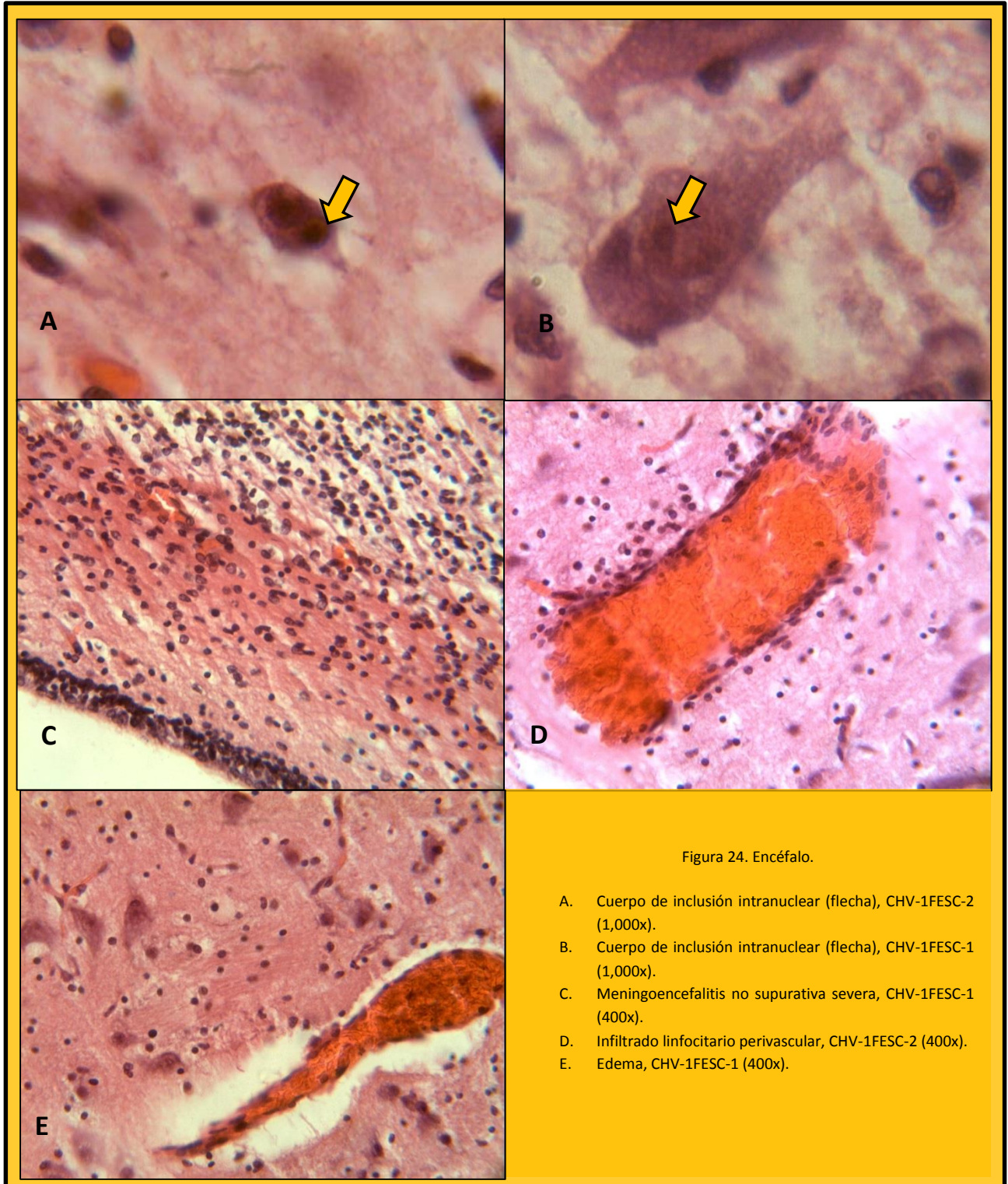
-Hígado (figuras 21 y 22): congestión difusa moderada, degeneración albuminosa difusa severa, hepatitis proliferativa perivascular leve a moderada, hemorragia multifocal leve, necrosis multifocal moderada.



-Intestino (figura 23): enteritis proliferativa difusa leve, hemorragia multifocal moderada.

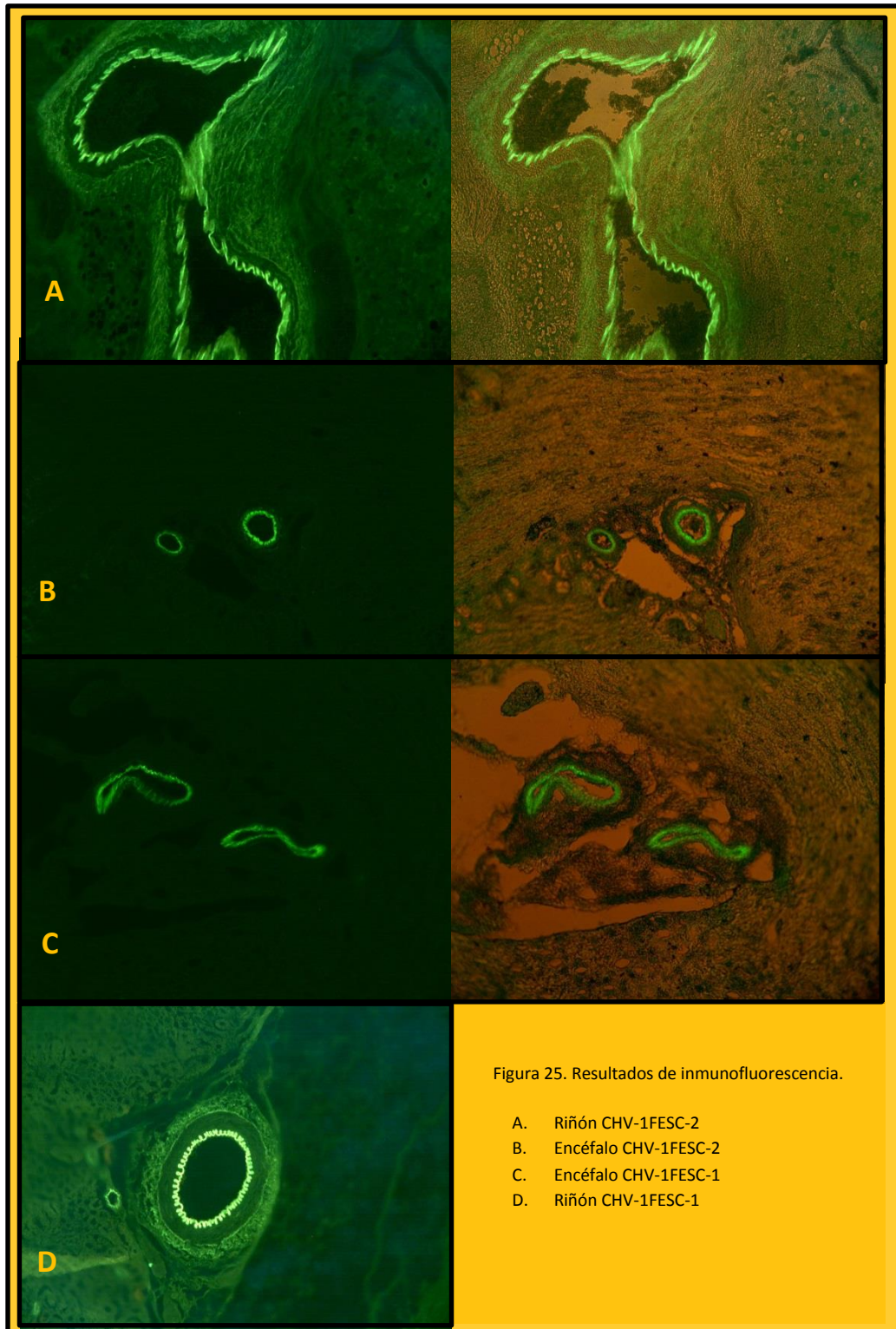


-Encéfalo (figura 24): congestión difusa moderada a severa, meningoencefalitis no supurativa difusa severa, infiltración linfocitaria perivascular, presencia de cuerpos de inclusión intranucleares.



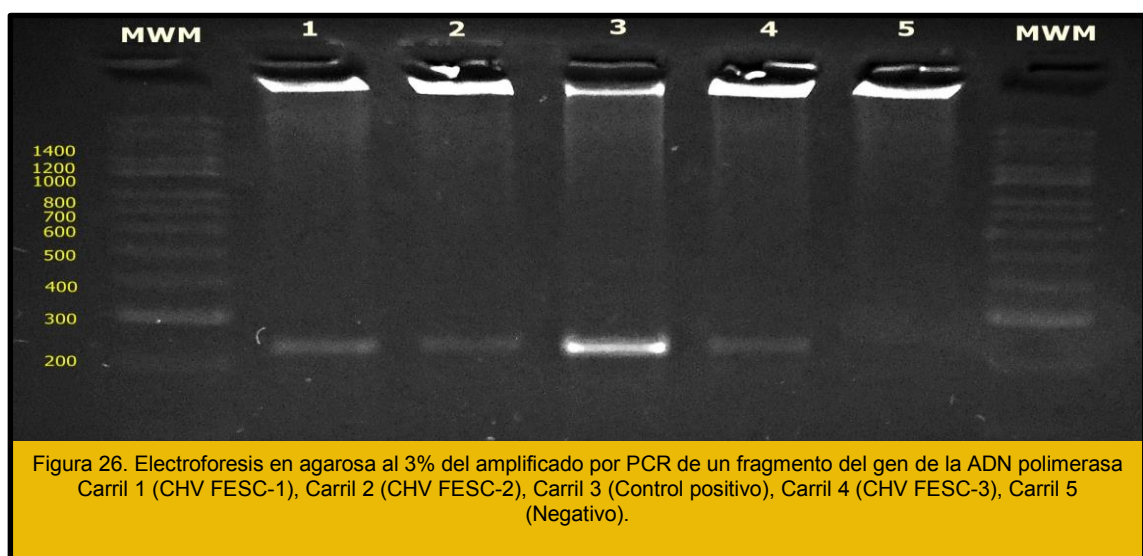
Inmunofluorescencia sobre tejido.

La técnica de inmunofluorescencia resultó positiva encontrándose mayor marcaje fluorescente hacia el endotelio vascular (figura 25).



Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Adicionalmente, se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita por VanDeVanter en 1996, la cual amplifica un fragmento de entre 215 y 315 pb del gen de la ADN polimerasa viral, un gen muy conservado entre los herpesvirus de toda la familia, por lo que se utilizó una muestra de herpes simplex tipo 1 (HSV-1) como control positivo (figura 26).



Aislamiento Viral.

Una muestra adicional fue donada por la Doctora Laura Cobos Marín, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, la muestra se identificó como CHV-1L.Cobos-1. Esta muestra corresponde al segundo pase en membrana corioalantoidea de embrión de pollo y fue obtenida a partir de un inóculo de riñón de un neonato que falleció en un criadero en el que se sospecha de la presencia de la enfermedad.

El cultivo viral, realizado en células MDCK, de riñón de perro, mostró resultados citopáticos y citolíticos moderados (tabla 3, figura 27), siendo la temperatura a la que mayores efectos se observaron entre 34 y 35°C.

Tabla 3. Efectos sobre las células MDCK por los aislamientos de CHV-1

CASO	TEJIDO	EFFECTOS A LOS 5 DIAS
CHV-1FESC-1	Encéfalo	++
CHV-1FESC-1	Hígado	++
CHV-1FESC-1	Riñón	++
CHV-1FESC-1	Pulmón	++
CHV-1FESC-1	Bazo	+
CHV-1FESC-2	Encéfalo	++++
CHV-1FESC-2	Hígado	++
CHV-1FESC-2	Riñón	++
CHV-1FESC-2	Pulmón	++
CHV-1FESC-2	Bazo	+
CHV-1FESC-3	Encéfalo	+++
CHV-1FESC-3	Hígado	++
CHV-1FESC-3	Riñón	++
CHV-1FESC-3	Pulmón	++
CHV-1FESC-3	Bazo	++
CHV-1L.COBOS-1	E.P.	++

.E.P.= Primo aislamiento en embrión de pollo, +=Efectos leves sobre las células, ++=Efectos moderados sobre las células, +++=Efectos marcados sobre las células, ++++=Efectos severos sobre las células.

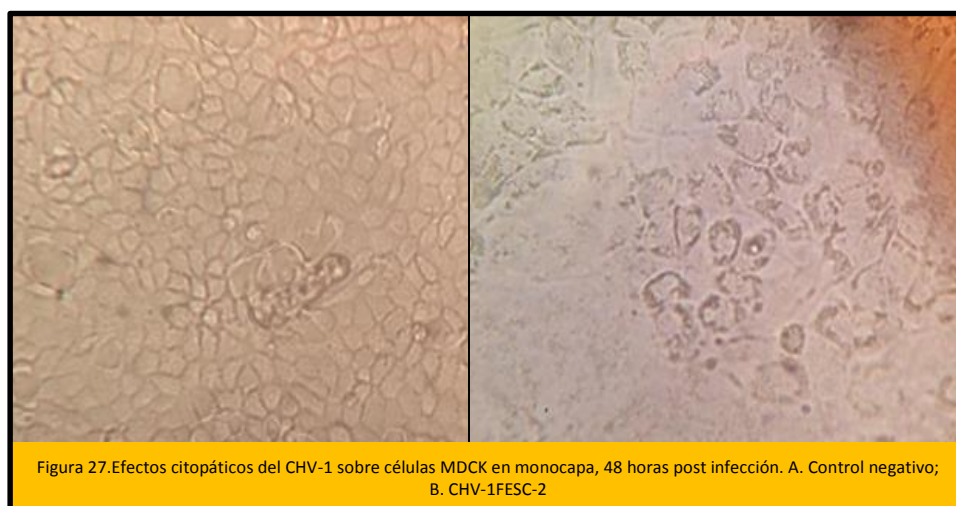
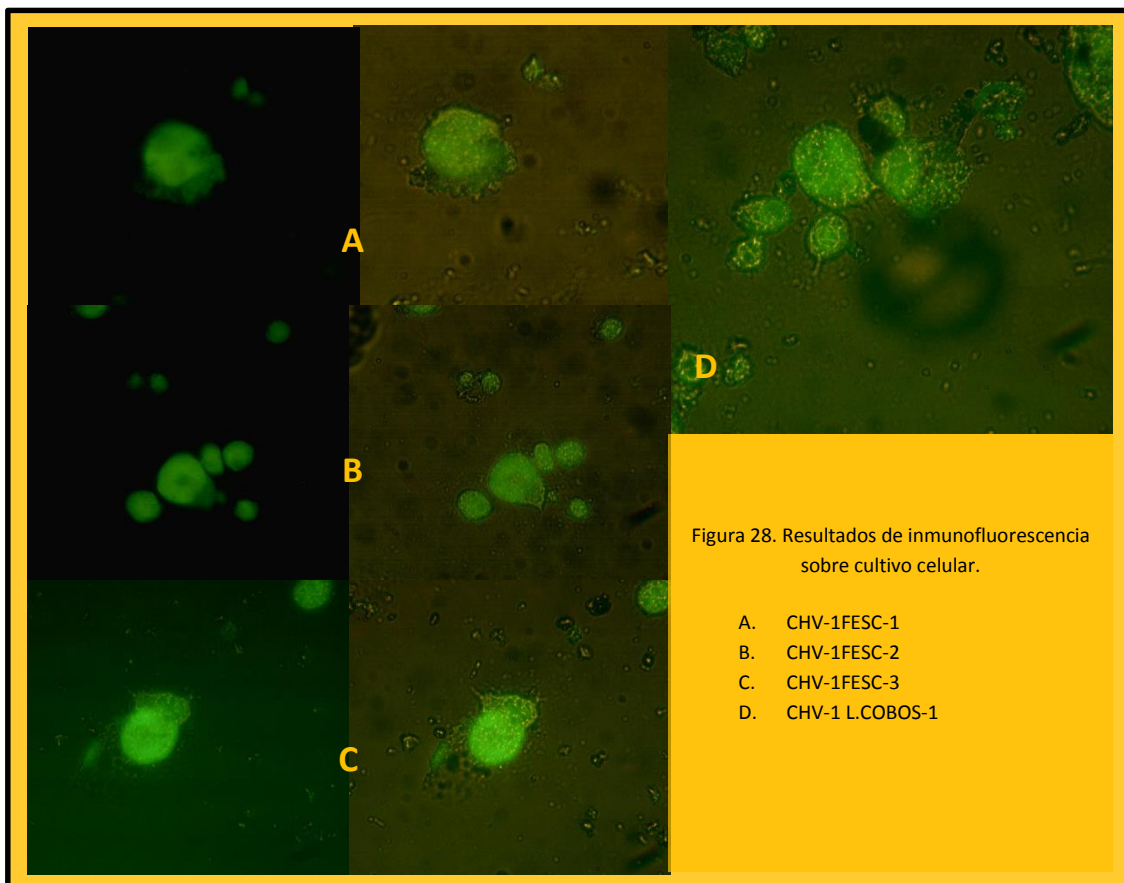


Figura 27.Efectos citopáticos del CHV-1 sobre células MDCK en monocapa, 48 horas post infección. A. Control negativo; B. CHV-1FESC-2

Identificación viral del aislamiento.

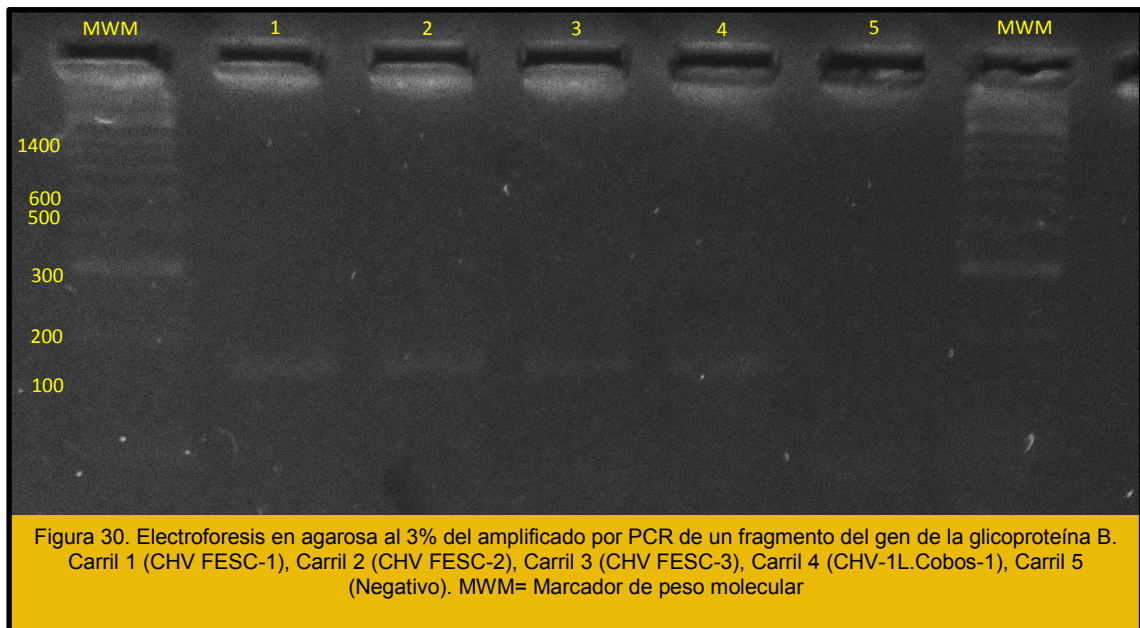
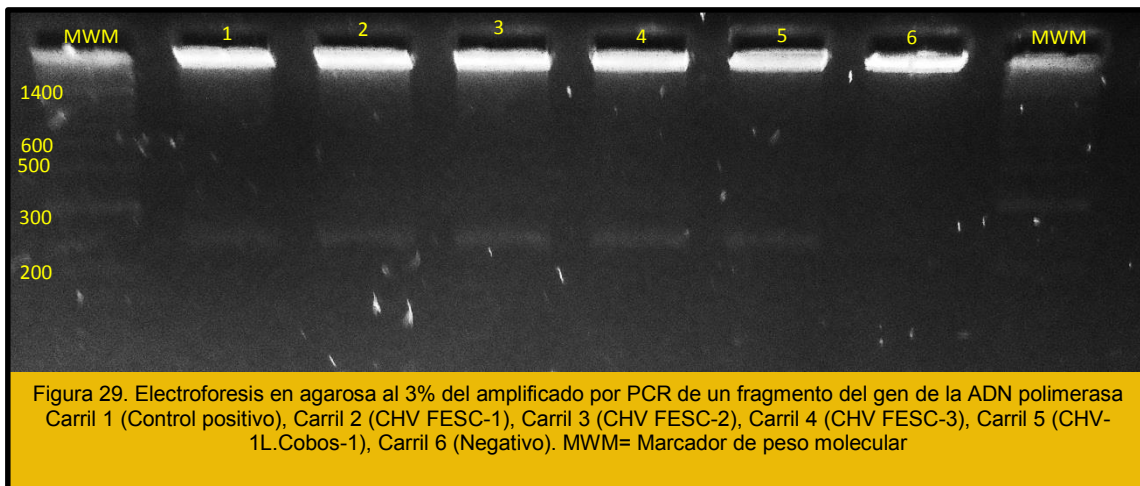
La confirmación de la identidad viral sobre cultivo celular se realizó mediante tres técnicas: inmunofluorescencia, reacción en cadena de la polimerasa y microscopía electrónica de transmisión. Se eligieron únicamente los tejidos que mostraron mayores efectos sobre las células, es decir Encéfalo para las CHV-1FESC-2 y 3, e Hígado para la CHV-1FESC-1. La muestra CHV-1L.Cobos-1 fue una muestra única.

Con la técnica de Inmunofluorescencia se observó una fuerte positividad, principalmente en el núcleo (Figura 28).



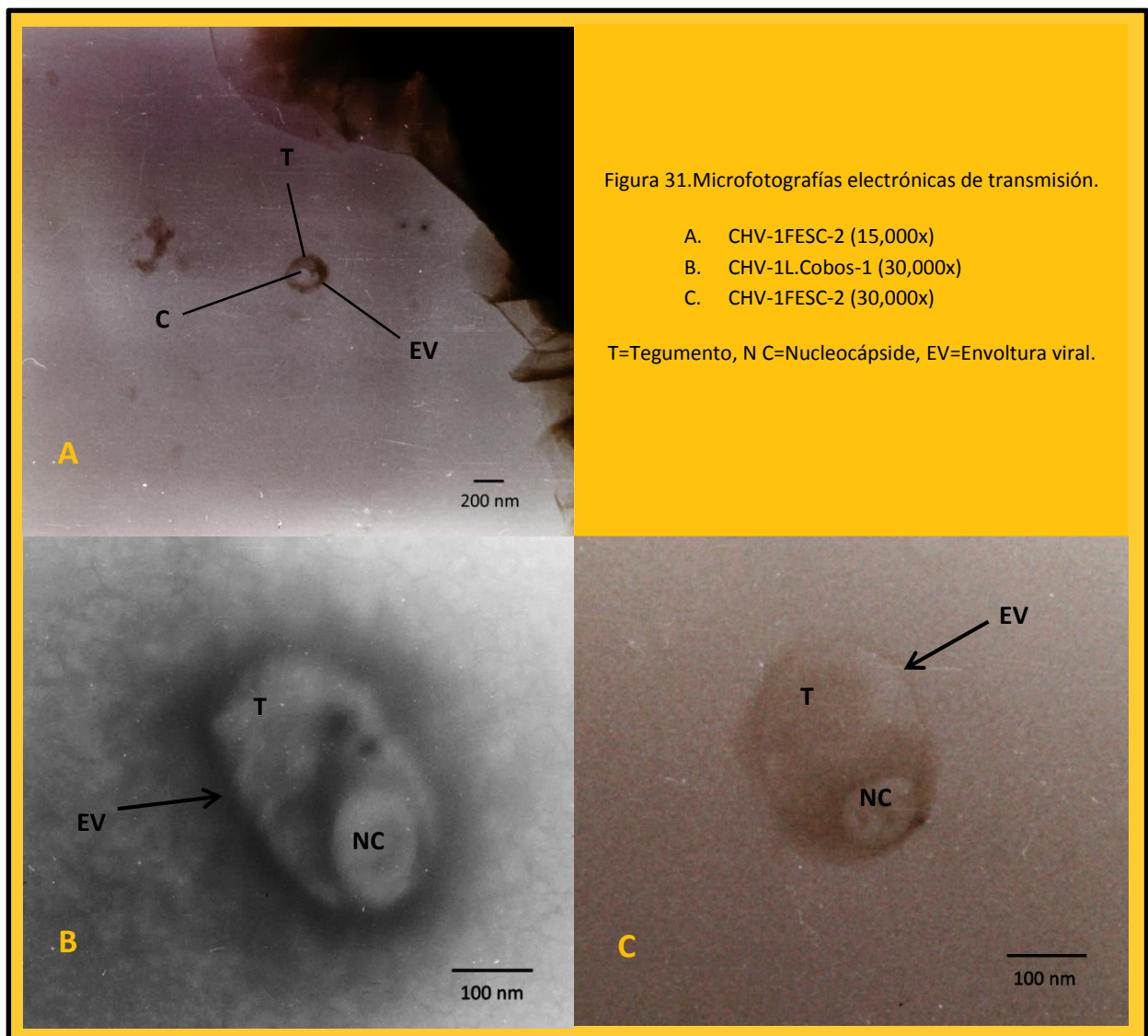
Reacción en cadena de la polimerasa.

Para la identificación también se utilizó la técnica de PCR, mediante dos protocolos, el descrito por Van de Vanter en 1996 (Figura 29) el cual amplifica un fragmento del gen de la ADN polimerasa de 215 a 315 pares de bases. Y el protocolo descrito por Burr y colaboradores en 1996, el cual amplifica un fragmente del gen de la glicoproteína B, de aproximadamente 120 pares de bases (Figura 30).



Microscopía electrónica de transmisión.

Mediante la técnica de Microscopía electrónica de transmisión se encontraron partículas compatibles con Herpesvirus, de cápsides midiendo aproximadamente 100 nm de diámetro, y el virión completo midiendo entre 200 y 280 nm de diámetro (figura 31).



Serología.

De acuerdo al cálculo de número de muestra, se requerían muestrear 96.04 individuos, por lo que se cerró el número a 100 caninos de más de 1 año de edad y menos de 7 años, todos ellos provenientes de ocho criaderos en la zona de influencia de la FES-Cuautitlán, clínicamente sanos (Tabla 4).

De los ocho criaderos muestreados, el identificado con el número cinco contó con el mayor número de individuos (32), mientras que el número seis contó únicamente con tres individuos (Figura 32).

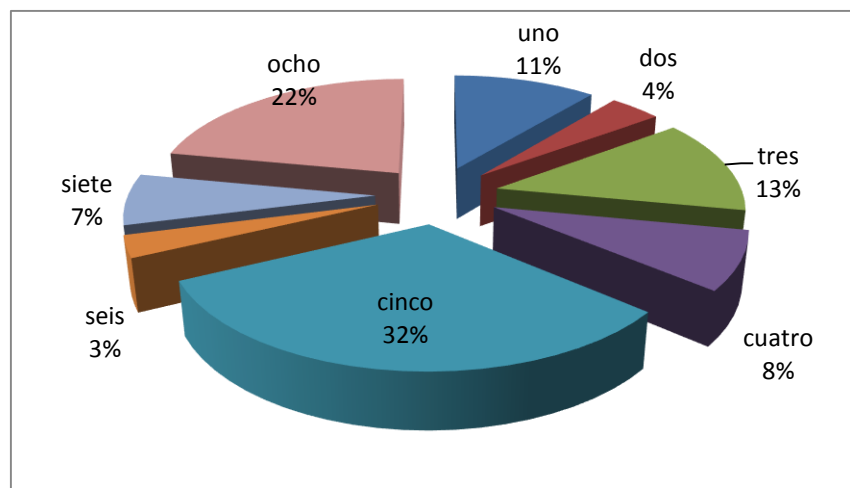


Figura 32. Distribución de caninos por criadero

Se tuvieron 11 razas diferentes (Pug, Doberman, Bulldog inglés, Pastor alemán, Westhighland White Terrier, Dachshund, Mastín napolitano, Gran Danés, Labrador, Chihuahueño y Cobrador), cuyas distribuciones se muestran en la figura 33. Se muestreó mayormente a la raza Dachshund.

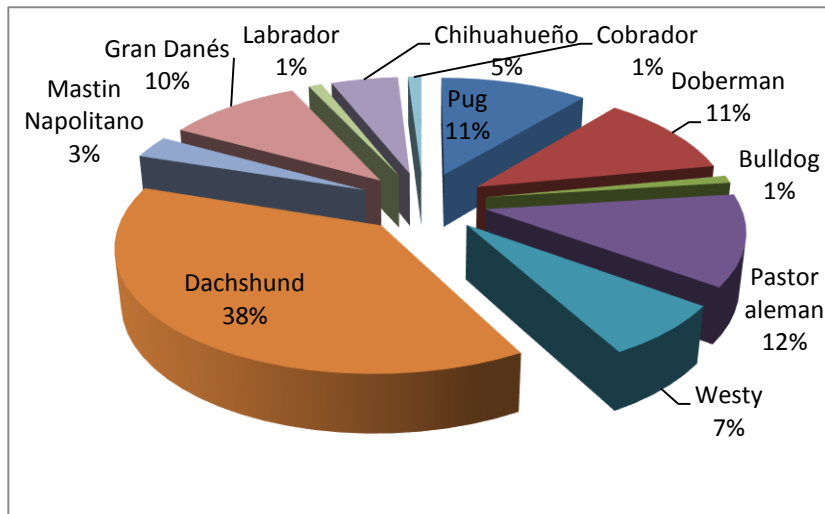


Figura 33. Distribución de caninos por raza

La mayor parte de los individuos muestreados fueron hembras (68%), con un 32% de machos. El promedio de edad fue de 43.67 meses (3.64 años).

Durante el muestreo se realizó una encuesta que incluía algunos datos del propietario y del criadero, edad, peso, talla, raza, etc. Así como historial de enfermedades oculares, cutáneas, de traqueobronquitis infecciosa y reproductivas (presentaciones clínicas de herpesvirosis canina) (figura 34).



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ENCUESTA INDIVIDUAL PARA EL MUESTREO SEROLÓGICO EN CANINOS.

Nombre del criadero: _____

Nombre del propietario: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____ Correo electrónico: _____

1- Número de muestra: _____

2- Nombre del canino: _____

3- Identificación (Tatuaje o microchip): _____

4- Raza: _____

5- Sexo: _____

6- Edad: _____

7- Peso: _____

8- Talla: _____

9- Estado general de salud: _____

10- País de nacimiento: _____

11- ¿Ha salido del país?, ¿A qué países?: _____

12- ¿Tiene cuadro de vacunación completo (nacional)?: _____

13- ¿Ha recibido alguna inmunización contra Herpesvirus canino?: _____

14- ¿Se ha "cruzado"? ¿Monta natural o inseminación? _____

15- ¿Ha tenido camadas?, ¿Cuántas? (Solo hembras) _____

16- ¿Ha presentado algún problema reproductivo?, ¿Cuál? _____

17- ¿Ha presentado traqueobronquitis infecciosa (Tos de las perreras)? _____

18- ¿Ha presentado problemas oculares? _____

19- ¿Ha presentado problemas cutáneos? _____

20- Tiempo desde que ingresó al criadero: _____

Figura 34. Encuesta realizada a criadores, dueños de los caninos muestreados.

Con la encuesta se observó que el 86% de los individuos habían nacido en México; mientras que de los 14 restantes, 4 nacieron en USA, 4 en Chile, 1 en Argentina, 1 en Dinamarca y 1 en España. El 85% de los individuos no han salido nunca del país.

Todos los caninos presentaban un cuadro de vacunación nacional completo, y ninguno había sido inmunizado previamente con CHV-1.

El 61% de los animales muestreados había copulado, mientras que 32 de las 68 hembras habían tenido al menos una camada.

Según la encuesta, el 26% de los individuos muestreados ha presentado problemas reproductivos, 14% traqueobronquitis infecciosa, 1% problemas oculares y 4% problemas en piel (no relacionados a la presentación cutánea de traqueobronquitis infecciosa).

Prueba de ELISA (EVL, Netherlands)

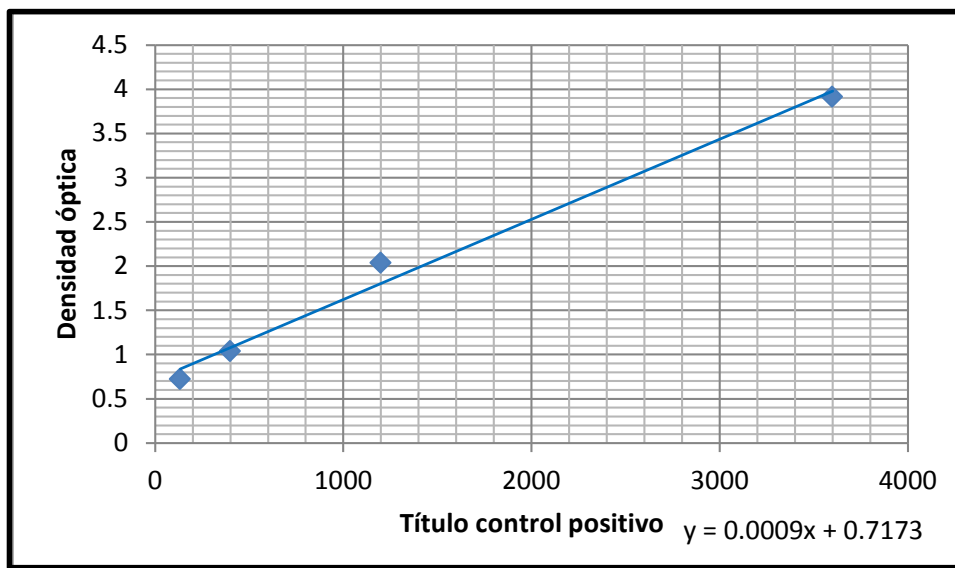
De acuerdo a las recomendaciones del Dr Ir J R Van Herwijnen de la empresa EVL, se realizó el corrimiento de las muestras a dilución 1:250, mientras que se procesaron los controles positivo y negativo en diluciones 1:30, 1:60, 1:90 y 1:270.

Al control positivo se le restó la densidad óptica (OD) del control negativo para realizar un ajuste (en cada dilución), mientras que a la OD de las muestras se les restó el resultado de OD del control negativo a la dilución más parecida, es decir 1:270.

En la figura 35 se muestran los resultados del control positivo (ajustado con el negativo) en donde se compararon los resultados de la OD obtenida con el título

que según la empresa fabricante posee el control positivo y se obtuvo la ecuación de la gráfica, obteniendo el intercepto y la pendiente.

Figura 35. Relación de la densidad óptica obtenida, con el título supuesto del control positivo.



De acuerdo a la ecuación de la gráfica se sustituyeron los resultados de la densidad óptica obtenida (ajustada con el control negativo) de cada una de las muestras y se obtuvo el título calculado (Tabla 4). Cabe destacar que algunos valores son negativos debido a que son el resultado de una fórmula, no un título observado.

Tabla 4. Título de anticuerpos anti CHV-1 calculado mediante la prueba de ELISA EVL™ de los animales muestreados.

Muestra	criadero	Raza	Sexo	Edad (meses)	Título calculado
001	1	Pug	Hembra	39	*1069.4
002	1	Pug	Macho	46	*295.5
003	1	Pug	Hembra	14	*376.1
004	1	Pug	Hembra	14	*854.1
005	1	Pug	Macho	27	*1812.3
006	1	Pug	Macho	13	*1492.2
007	1	Pug	Hembra	58	*462.2
008	1	Pug	Hembra	51	*545.0
009	1	Pug	Hembra	32	73.6
010	1	Pug	Hembra	37	-255.4
011	1	Pug	Hembra	24	*1000.9
012	2	Doberman	Macho	13	*1120.2
013	2	Bulldog	Hembra	42	*760.3
014	3	Pastor alemán	Hembra	48	-204.6
015	3	Pastor alemán	Macho	36	-252.1
016	3	Pastor alemán	Hembra	72	-483.9
017	3	Pastor alemán	Hembra	36	-382.4
018	3	Pastor alemán	Hembra	14	*166.3
019	3	Westy	Hembra	84	*2049.7
020	3	Westy	Hembra	24	*351.8
021	3	Westy	Hembra	29	*1864.2
022	3	Westy	Hembra	24	*225.9
023	3	Westy	Hembra	29	*2748.5
024	3	Pastor alemán	Hembra	60	-336.0
025	6	Mastín Napolitano	Hembra	48	*521.8
026	6	Mastín Napolitano	Macho	45	*1390.6
027	7	Pastor alemán	Hembra	39	*240.3
028	7	Pastor alemán	Hembra	30	*242.5
029	7	Westy	Macho	72	-63.3
030	7	Westy	Hembra	48	*570.4
031	6	Mastín Napolitano	Hembra	48	*2037.6
032	2	Gran Danés	Hembra	18	*1494.4
033	2	Gran Danés	Hembra	30	*2190.9
034	3	Pastor alemán	Hembra	42	*140.2
035	7	Pastor alemán	Macho	72	*337.8
036	7	Pastor alemán	Macho	24	*950.4
037	7	Pastor alemán	Hembra	30	*1996.7
038	4	Gran Danés	Macho	12	*2083.9
039	4	Gran Danés	Macho	12	*963.2
040	4	Gran Danés	Macho	13	*221.5
041	4	Gran Danés	Hembra	12	*1366.6
042	4	Gran Danés	Hembra	84	*1021.4
043	4	Gran Danés	Hembra	48	*1956.0
044	4	Gran Danés	Hembra	48	*3262.7
045	4	Gran Danés	Macho	60	*2718.7
046	5	Dachshund	Hembra	72	*1200.4
047	5	Dachshund	Hembra	83	*766.8
048	5	Dachshund	Hembra	83	*972.5
049	5	Dachshund	Macho	36	*967.9
050	5	Dachshund	Hembra	38	*1449.2

* Resultado positivo.

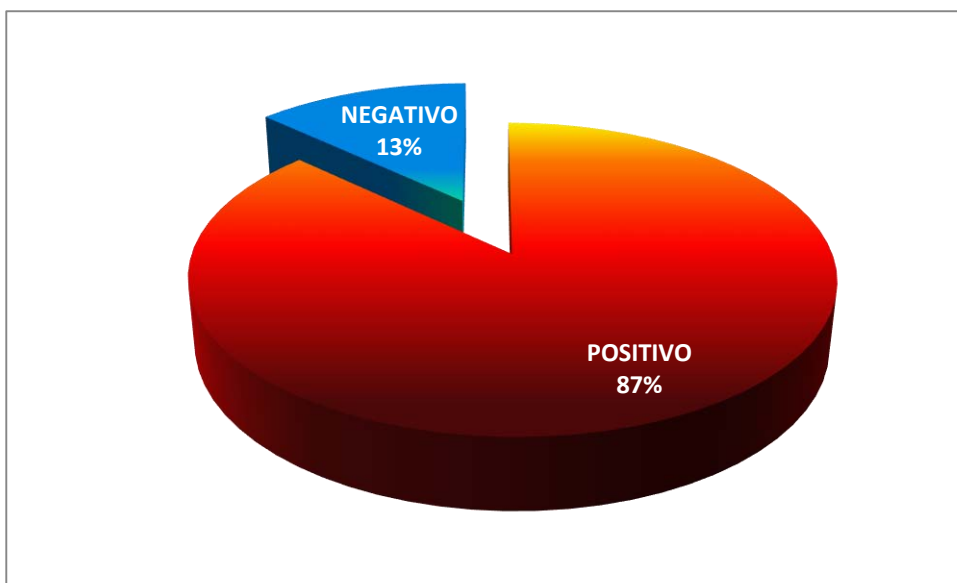
Tabla 4 (continuación). Título de anticuerpos anti CHV-1 calculado mediante la prueba de ELISA EVL™ de los animales muestreados.

Muestra	criadero	Raza	Sexo	Edad (meses)	Título calculado
051	5	Dachshund	Macho	84	*452.9
052	5	Dachshund	Macho	60	*1103.9
053	5	Dachshund	Hembra	13	*1306.2
054	5	Dachshund	Hembra	12	*1355.0
055	5	Dachshund	Hembra	84	*2655.9
056	5	Dachshund	Hembra	38	*1037.6
057	5	Dachshund	Hembra	83	*1052.7
058	5	Dachshund	Macho	12	*1530.5
059	5	Dachshund	Macho	81	*605.2
060	5	Dachshund	Hembra	25	*1915.3
061	5	Dachshund	Macho	84	*667.9
062	5	Dachshund	Hembra	36	*1398.0
063	5	Dachshund	Macho	82	*198.3
064	5	Dachshund	Macho	48	*264.5
065	5	Dachshund	Hembra	84	*1670.1
066	5	Dachshund	Macho	83	*2361.8
067	5	Doberman	Hembra	24	*869.3
068	5	Doberman	Hembra	25	*1253.4
069	5	Doberman	Macho	80	*1283.6
070	5	Doberman	Hembra	12	*1176.8
071	5	Doberman	Macho	13	*714.9
072	5	Doberman	Hembra	13	*886.7
073	5	Doberman	Macho	13	*1276.6
074	5	Doberman	Macho	13	*218.2
075	5	Cobrador	Hembra	36	*834.5
076	5	Doberman	Macho	60	*1333.5
077	8	Dachshund	Hembra	36	*887.8
078	8	Dachshund	Hembra	12	*981.8
079	8	Dachshund	Hembra	12	*484.0
080	8	Dachshund	Macho	14	*1347.4
081	8	Dachshund	Hembra	36	12.8
082	8	Dachshund	Hembra	12	*130.0
083	8	Dachshund	Macho	36	*2575.3
084	8	Dachshund	Hembra	66	*1786.1
085	8	Dachshund	Hembra	84	*732.3
086	8	Dachshund	Hembra	84	*1807.0
087	8	Dachshund	Hembra	72	*3812.5
088	8	Labrador	Macho	30	*550.1
089	8	Chihuahueño	Hembra	60	-142.8
090	8	Chihuahueño	Hembra	84	61.5
091	8	Chihuahueño	Hembra	16	*423.6
092	8	Chihuahueño	Hembra	84	25.5
093	8	Dachshund	Hembra	12	*1580.7
094	8	Dachshund	Hembra	80	*125.3
095	8	Dachshund	Macho	48	*651.1
096	8	Dachshund	Hembra	72	*880.9
097	8	Dachshund	Hembra	84	*1308.0
098	8	Dachshund	Macho	12	*1182.6
099	5	Doberman	Hembra	48	*779.9
100	3	Chihuahueño	Hembra	62	-95.2

* Resultado positivo.

De acuerdo con las recomendaciones por el Dr Van Herwijnen, se tomaron como positivos a los individuos que tuvieran un título calculado mayor a 100, teniendo 87 individuos con esta característica (Figura 36).

Figura 36. Seroprevalencia por la técnica de ELISA de los caninos muestreados.



Con la ayuda del programa Statgraphics® se procesaron los datos mediante el tipo de análisis de Modelos Lineales Generalizados, utilizando como Variable dependiente al título calculado y las Variables independientes el resto de factores (edad, sexo, raza, criadero, peso, talla, país de nacimiento, si ha copulado o no, el número de camadas, si ha presentado traqueobronquitis infecciosa, problemas oculares, cutáneos o reproductivos).

Esta función de Modelos lineales generalizados, genera un modelo matemático por medio de una ecuación con los factores utilizados, y muestra si el modelo es probable o no. De no ser probable el modelo, indica qué factores son los que están menos relacionados con la variable dependiente, las cuales se van eliminando hasta quedar las variables que, ajustadas en el modelo, tengan una relación estadísticamente significativa (Montgomery 2004).

Para nuestro estudio, las únicas variables que presentaron dicha relación fueron “Raza” y “Criadero”, teniendo en cuenta que la variable “Raza” se encuentra anidada al factor “Criadero”, ya que depende de qué criadero se trate, son las razas que se encuentran en cada uno. Se obtuvo un valor de p de 0.0006, y una R^2 de 0.3649, lo que indica que el 36.49% de la variabilidad del título calculado se explica con las variables Raza y Criadero (Figuras 37 y 38, Tablas 5 y 6).

Ninguno de los otros factores (edad, sexo, peso, historial de traqueobronquitis infecciosa, historial de problemas cutáneos, historial de problemas reproductivos, historial de problemas oculares, país de nacimiento, si se ha realizado monta o no y número de camadas) presentó relación estadísticamente significativa con el título final calculado.

Figura 37. Medias e intervalos LSD (95%) del título calculado por criadero.

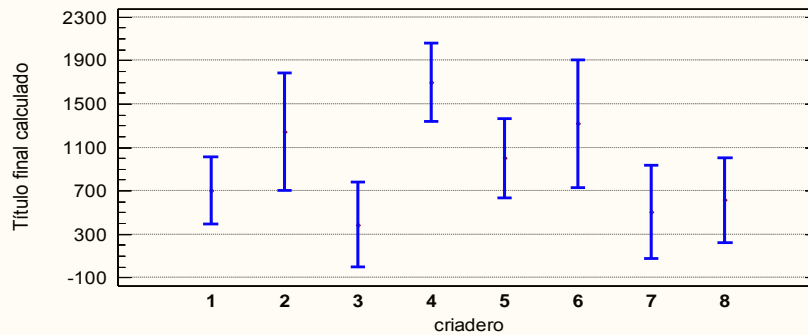


Tabla 5. Comparaciones múltiples para título calculado por criadero 95% LSD.

<i>criadero</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
3	13	386.535	280.334	X
7	7	503.545	303.599	X
8	22	611.774	276.758	X
1	11	702.355	218.819	X
5	32	1000.35	259.155	XX
2	4	1241.05	382.499	XX
6	3	1316.67	419.007	XX
4	8	1699.25	256.588	X

Usando columnas de X's se observa que dentro de cada columna, los niveles conteniendo X's forman un grupo sin diferencias estadísticamente significativas. Se presentan diferencias entre el grupo 4 con los grupos 1, 3, 7 y 8.

De los dos factores que presentan relación estadística con el título calculado, el factor "criadero" mostró diferencias estadísticamente significativas con el nivel 4 (criadero identificado con el número 4) en contra de los niveles 1, 3, 7 y 8 (figura 37, tabla 5).

Figura 38. Medias e intervalos LSD (95%) del título calculado por raza.

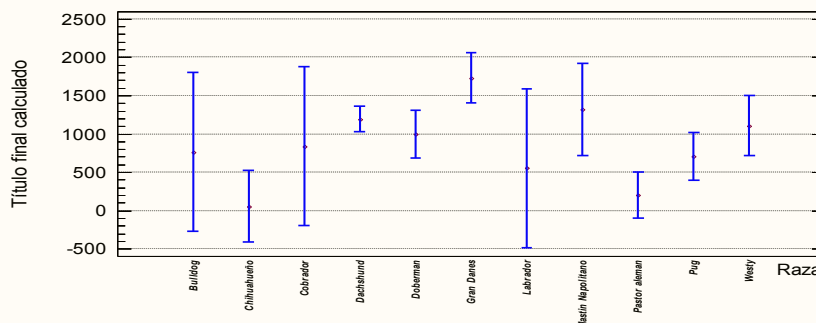


Tabla 6. Comparaciones múltiples para título calculado por raza 95% LSD.

Raza	Recuento	Media MC	Sigma MC	Grupos Homogéneos
Chihuahueño	5	54.52	329.957	X
Pastor alemán	12	201.267	212.986	X
Labrador	1	550.1	737.807	XXX
Pug	11	702.355	222.457	XX
Bulldog	1	760.3	737.807	XXX
Cobrador	1	834.5	737.807	XXX
Doberman	11	992.1	222.457	X
Westy	7	1106.74	278.865	XX
Dachshund	38	1189.95	119.688	X
Mastín Napolitano	3	1316.67	425.973	XX
Gran Danes	10	1727.93	233.315	X

Usando columnas de X's se observa que dentro de cada columna, los niveles conteniendo X's forman un grupo sin diferencias estadísticamente significativas.

De los dos factores que presentan relación estadística con el título calculado, el factor "raza" mostró diferencias estadísticamente significativas entre varios niveles. Las razas Chihuahueño y Pastor alemán presentaron títulos significativamente menores que las razas Doberman, Westhighland White Terrier (Westy), Dachshund, Mastín Napolitano y Gran Danés. La raza Gran Danés presentó los títulos más elevados, los cuales fueron estadísticamente diferentes que las razas Dachshund, Doberman, Pastor Alemán y Chihuahueño. Se debe

tener presente que estas relaciones se encuentran anidadas al criadero, es decir, depende qué criadero se está trabajando las razas que se presentan en él, por lo que no representa un factor de riesgo por raza, más bien por criadero.

Comparación de la prueba de ELISA (EVL™) con la técnica de Seroneutralización.

Titulación por medio de formación de conteo de unidades formadoras de focos peroxidasa positivos (UFFPP).

Se siguió el mismo protocolo descrito para la técnica de unidades formadoras de placas, realizando una tinción de inmunoperoxidasa dirigida contra el herpesvirus canino para una mayor visualización de las placas. Sin embargo, dichas placas únicamente fueron visibles microscópicamente, por lo que se utilizará el término de “focos peroxidasa positivos”. (Figura 39).

Al diluir el virus en forma decimal y detectar el efecto citopático mediante la técnica de inmunoperoxidasa antes descrita, se determinó que únicamente en la dilución 1:100, el número de focos peroxidasa positivos por pozo estuvo comprendido en el rango de 20 a 100 (Tabla 7), rango que ha sido previamente validado estadísticamente como útil para este tipo de métodos de titulación (Barrón 2007).

Tabla 7. Conteo de focos peroxidasa positivos para la titulación del CHV-1

Dilución	Número de focos positivos	Interpretación
1:10	Incontables	N/A
1:100	86	17,200 UFP / ml
1:1,000	18	N/A
1:10,000	0	N/A
1:100,000	0	N/A

Se diluyó el herpesvirus canino en forma decimal, se infectaron células MDCK y posterior a la incubación se tiñó con inmunoperoxidasa con un conjugado anti-CHV. N/A el número de focos positivos no se encontraba dentro del rango de 20 a 100, por lo que no es válido para el cálculo del título.

Se obtuvo un título de 17.2×10^3 unidades formadoras de placa por mililitro de cultivo viral (UFP/ml).



Figura 39. Focos peroxidasa positivos sobre cultivo celular. Células MDCK a las 72 horas de incubación.

Los resultados serológicos de neutralización viral se realizaron para 20 de las muestras de caninos, seleccionadas aleatoriamente. Se observan en la tabla 8:

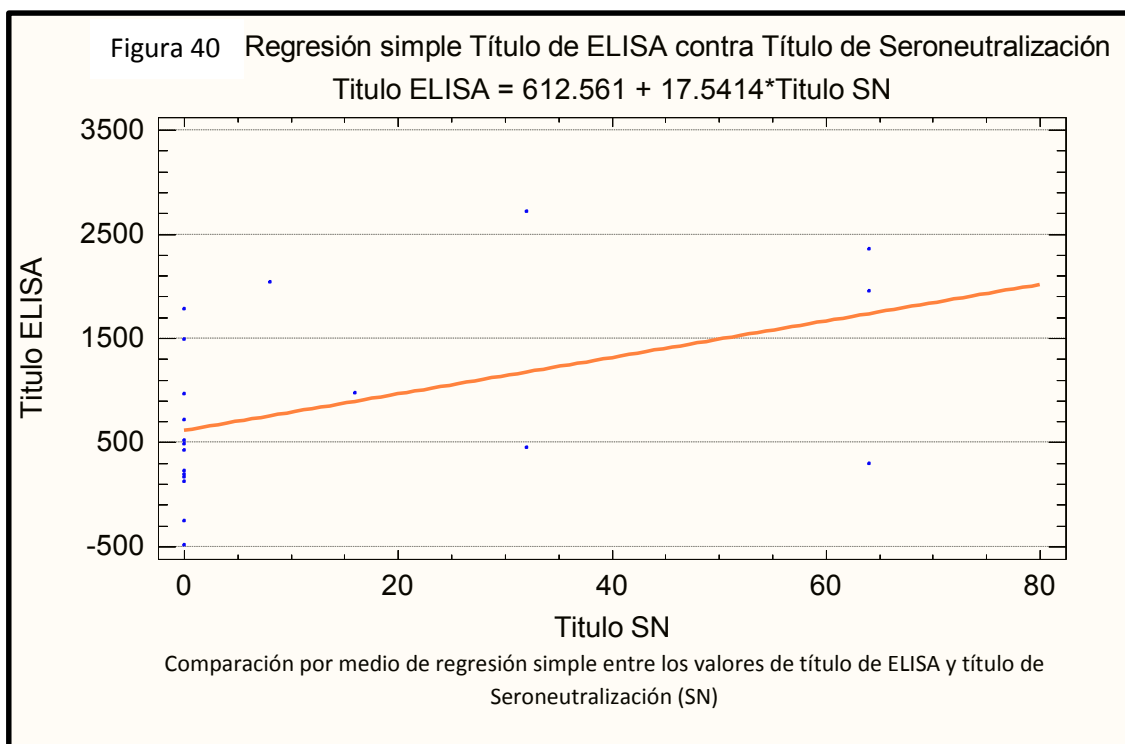
Tabla 8. Tabulador de los individuos muestreados y el título de seroneutralización.

Muestra	criadero	Raza	Sexo	Edad (meses)	Título calculado ELISA	Título Seroneutralización
002	1	Pug	Macho	46	295.5	64
015	3	Pastor alemán	Macho	36	-252.1	<8
016	3	Pastor alemán	Hembra	72	-483.9	<8
018	3	Pastor alemán	Hembra	14	166.3	<8
022	3	Westy	Hembra	24	225.9	<8
025	6	Mastín Napolitano	Hembra	48	521.8	<8
031	6	Mastín Napolitano	Hembra	48	2037.6	8
032	2	Gran Danés	Hembra	18	1494.4	<8
039	4	Gran Danés	Macho	12	963.2	<8
043	4	Gran Danés	Hembra	48	1956.0	64
045	4	Gran Danés	Macho	60	2718.7	32
048	5	Dachshund	Hembra	83	972.5	16
051	5	Dachshund	Macho	84	452.9	32
063	5	Dachshund	Macho	82	198.3	<8
066	5	Dachshund	Macho	83	2361.8	64
071	5	Doberman	Macho	13	714.9	<8
079	8	Dachshund	Hembra	12	484	<8
084	8	Dachshund	Hembra	66	1786.1	<8
091	8	Chihuahueño	Hembra	16	423.6	<8
094	8	Dachshund	Hembra	80	125.3	<8

Para poder comparar ambas pruebas, se hicieron dos tipos de análisis; una prueba de regresión simple y una tabla de contingencia.

Se realizó una correlación entre los resultados del título calculado por ELISA y el título de seroneutralización por medio de una regresión simple para comparar ambas pruebas. Para la construcción del modelo, se consideraron los títulos menores a 8 en seroneutralización como negativos (valor de 0).

Los resultados se muestran en el siguiente gráfico (Figura 40):



Se obtuvieron, con el análisis de regresión simple, los siguientes valores:

-Coeficiente de correlación: **0.4626**

-R²: **21.40 %**

-Valor P del análisis de varianza comparando los valores de título de ELISA contra título de seroneutralización: **p=0.04**.

Dado que el análisis de varianza arrojó un valor de P menor a 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre el título de ELISA y el título de seroneutralización (SN) con un nivel de confianza del 95%.

Además, la R^2 indica que el modelo explica solamente el 21.40% de la variabilidad en el título de ELISA. El coeficiente de correlación es de 0.4626, lo que indica una relación muy baja entre ambas variables.

Se realizó, por otra parte, la comparación de los resultados en forma de variables categóricas (positivo o negativo) para lo cual se tomaron los resultados como negativo (Título de ELISA menor a 100, título de seroneutralización <8) o positivo (Título de ELISA mayor a 100, título de seroneutralización mayor o igual a 8), y se realizó el cuadro de contingencia, quedando de la siguiente forma (Tabla 9):

Tabla 9. Cuadro de contingencia para validar la técnica de ELISA con respecto a la seroneutralización.

SERONEUTRALIZACION			
ELISA	Positivo	Negativo	TOTAL
Positivo	a=7	c=11	18
Negativo	b=0	d=2	2
TOTAL	7	13	n = 20

Con este cuadro se calculó el coeficiente de concordancia Kappa, el cual es una medida estadística que ajusta el efecto del azar en la proporción de una concordancia observada; es decir, mide el acuerdo entre dos observadores (en este caso, las dos pruebas) eliminando el efecto del azar.

Para calcularlo se utilizó la siguiente fórmula:

$$k = \frac{Co - Ce}{1 - Ce}$$

Donde:

Co: Concordancia observada: $\frac{(a+d)}{n}$

Ce: Concordancia esperada: $\frac{(a+b)(a+c)}{n^2} + \frac{(c+d)(b+d)}{n^2}$

El cálculo nos arroja un coeficiente de concordancia de **0.1129** que, de acuerdo a Landis y Koch (tabla 10) es una fuerza de concordancia leve.

Tabla 10. Valoración del coeficiente kappa de acuerdo a Landis y Koch, 1977.

Coeficiente kappa	Fuerza de concordancia
0.00	Pobre
0.01 – 0.20	Leve
0.21 – 0.40	Aceptable
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Considerable
0.81 – 1.00	Casi perfecta

Por otra parte, se realizó el análisis comparativo entre ambas pruebas para los cálculos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos, tomando en cuenta que no se contamos con un verdadero positivo (un canino del que se tenga certeza de infección) ni un verdadero negativo (un canino del que se tenga certeza de ausencia de infección); por lo que la prueba de seroneutralización no funge como “estándar de oro”. Únicamente se realiza este análisis como un

ejercicio de comparación entre ambas pruebas, por lo que no es un elemento que realmente determine la sensibilidad, especificidad ni valores predictivos de la prueba de ELISA.

Para poder contar con individuos clasificados como verdaderos positivos o negativos, se tendría que realizar el aislamiento o, al menos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para confirmar o descartar la presencia del virus en el organismo.

El cuadro de contingencia genera algunos conceptos, como son verdadero positivo, verdadero negativo, falso positivo y falso negativo, como se ejemplifica en la tabla 11

Tabla 11. Cuadro de contingencia donde se explica la generación de conceptos para la interpretación.

SERONEUTRALIZACION		
ELISA	Positivo	Negativo
Positivo	VP (verdadero positivo)	FP (falso positivo)
Negativo	FN (falso negativo)	VN (Verdadero negativo)

La sensibilidad corresponde a la proporción de muestras que, siendo positivos a la prueba estándar de referencia (para este ejercicio se tomó en cuenta a la seroneutralización), es identificada como tal por la prueba diagnóstica a evaluar (ELISA). Dicho de otra forma, la sensibilidad es la probabilidad de clasificar correctamente como positivo una muestra que sea positiva de acuerdo al estándar de referencia. Es calculada mediante la división del número de

verdaderos positivos entre la sumatoria de los verdaderos positivos más los falsos negativos, es decir:

$$\text{Sensibilidad} = VP / (VP + FN)$$

Para este estudio, la sensibilidad de la prueba de ELISA, con respecto a la seroneutralización es de **1 (100%)**.

Una prueba diagnóstica de alta sensibilidad es útil en contextos clínicos donde el hecho de no diagnosticar la enfermedad (falsos negativos) genera más problemas que el exceso de diagnóstico (falsos positivos). Es el caso de tamizaje o “*screening*”, que se realiza aplicando una prueba diagnóstica que otorgue resultados válidos y confiables, que sea de bajo costo, de fácil realización y mínima incomodidad para el usuario.

La especificidad, por su parte, corresponde a la proporción de muestras que, siendo negativos a la prueba estándar de referencia (para este ejercicio se tomó en cuenta a la seroneutralización), son identificados como tal por la prueba diagnóstica a evaluar (ELISA). Es decir, es la probabilidad de clasificar correctamente a una muestra como negativa y que sea negativa de acuerdo al estándar de referencia. Es calculada mediante la división del número de verdaderos negativos entre la sumatoria de los verdaderos negativos más los falsos positivos, es decir:

$$\text{Especificidad} = VN / (VN + FP)$$

Para este estudio, se obtuvo una especificidad de **0.154 (15.4%)**.

Los valores predictivos positivo y negativo, reflejan la probabilidad de que un individuo presente o no la enfermedad cuando se obtiene un resultado positivo o negativo en la prueba. Sin embargo, para este ejercicio se tomará como “estándar de referencia” a la prueba de seroneutralización.

El valor predictivo positivo (VPP), para este ejercicio, corresponde a la probabilidad de que una muestra, al ser positiva mediante la prueba diagnóstica a evaluar (ELISA), sea positiva ante la prueba estándar de referencia (para este ejercicio se tomó en cuenta a la seroneutralización). Es calculada mediante la división del número de verdaderos positivos entre la sumatoria de los verdaderos positivos más los falsos positivos, es decir:

$$VPP = VP / VP + FP$$

Para este estudio, el valor predictivo positivo resultó en **0.39 (39%)**.

Por su parte, el valor predictivo negativo (VPN), para este ejercicio, corresponde a la probabilidad de que una muestra, al ser negativa mediante la prueba diagnóstica a evaluar (ELISA), sea negativa ante la prueba estándar de referencia (para este ejercicio se tomó en cuenta a la seroneutralización). Es calculada mediante la división del número de verdaderos negativos entre la sumatoria de los verdaderos negativos más los falsos negativos, es decir:

$$VPN = VN / VN + FN$$

Para este estudio, el valor predictivo negativo resultó de **1 (100%)**.

8. DISCUSIÓN.

Hasta el momento de escritura de la presente tesis, no existía otro trabajo publicado en México acerca de la presencia, infección o epidemiología del Herpesvirus canino (CHV-1), por lo que éste trabajo presenta las primeras evidencias patológicas que relacionan la muerte de cachorros de perro con el aislamiento e identificación del herpesvirus canino.

Necropsia. Hallazgos macroscópicos y microscópicos.

En cachorros neonatos el virus entra al torrente sanguíneo generando una viremia asociada a leucocitos, con replicación viral en el endotelio vascular que revisten los vasos sanguíneos pequeños, llevando a vasculitis necrosante con hemorragias secundarias (Puolet y col. 2001; Wright y Cornwell 1986). Las lesiones características de la infección por CHV-1 en cachorros neonatos incluyen hemorragias petequiales a equimóticas en múltiples órganos (Carmichael y col. 1965; Wright y Cornwell 1968; Poulet y col. 2001). Las dos necropsias realizadas durante el presente trabajo mostraron lesiones hemorrágicas en los órganos donde el CHV-1 tiende a replicarse, principalmente en riñón, hígado y pulmones. Las lesiones patológicas encontradas fueron altamente sugestivas de herpesvirosis canina, aunque existen otros agentes etiológicos que producen lesiones en el endotelio vascular llevando a hemorragias secundarias. La sepsis y la endotoxemia es una causa común de daño endotelial (McGavin & Zachary 2007) mientras que el Adenovirus canino (CAV-1) se replica en las células endoteliales vasculares y en hepatocitos, llevando a hemorragias equimóticas y petequiales en los órganos de cachorros (Decaro y col. 2008).

Las lesiones en riñón (hemorragias y necrosis), descritas como características de la infección por CHV-1 a nivel macroscópico (McGavin & Zachary 2007), se encontraron, pero con un grado de alteración menor, siendo mayormente evidenciadas durante la histopatología.

Otro de los hallazgos patológicos fue la presencia de edema pulmonar, que impedía el colapso normal de los pulmones al ser extraídos de la cavidad torácica, así como hepatomegalia. Lo anterior está dado, principalmente, por una respuesta celular de degeneración hidrópica que es resultado de una falla en el mantenimiento de la homeostasis celular (McGavin y Zachary 2007). Además, el edema pulmonar pudo haber sido resultado de la replicación viral en el endotelio vascular, lo que pudo haber llevado a un aumento en la permeabilidad vascular terminando en un edema secundario (McGavin y Zachary 2007).

Los hallazgos histopatológicos de las infecciones naturales o experimentales en cachorros neonatos se caracterizan por focos diseminados de necrosis con hemorragias periféricas en los riñones, pulmones, bazo, intestino delgado y encéfalo (Carmichael y col. 1965; Love y Huxtable 1976; Poulet y col. 2001), en los cachorros a los que se les realizó la necropsia se encontraron dichos focos de necrosis y hemorragia, siendo más marcadas las zonas de hemorragia, mientras que la necrosis se mantuvo en un grado moderado, además, no encontraron focos de necrosis en el encéfalo. Por otra parte, se encontró un fuerte infiltrado leucocitario, de predominio linfocítico en riñones, encéfalo y pulmones, contrario a lo que reporta Carmichael en 1965 que dice se puede encontrar un infiltrado leucocitario leve, pero que en general, raramente se encuentra inflamación en las áreas de necrosis.

Se lograron observar cuerpos de inclusión intranucleares, consistente a lo reportado por Greene en el 2012.

Identificación del agente etiológico por inmunofluorescencia y reacción en cadena de la polimerasa.

Se logró la identificación viral por medio de las técnicas de inmunofluorescencia y PCR.

La inmunofluorescencia produjo una mayor positividad en el endotelio vascular, principalmente de riñón y encéfalo. Esto es congruente con lo descrito por McGavin y Zachary en el 2007, quienes indican que la replicación viral se da particularmente en las células de los endotelios vasculares.

Por medio de la PCR se lograron amplificados de aproximadamente 250 pares de bases, compatible con los descrito por el autor que los diseñó, Van de Vanter en 1996, el cual menciona que se esperan amplificados entre 125 y 315 pares de bases.

Aislamiento e identificación viral.

Este trabajo representa el primer estudio acerca del aislamiento del CHV-1. Se consiguió para los tres cachorros a los que se les realizó la necropsia, así como para la muestra adicional donada por la Doctora Laura Cobos.

Se lograron efectos citopáticos y citolíticos en células de origen canino (MDCK), los efectos citopáticos se observaron desde las 48 horas post infección, mientras que las alteraciones citolíticas se encontraron a partir de las 72 horas. La identificación viral se consiguió mediante las técnicas de PCR, inmunofluorescencia y microscopía electrónica de transmisión.

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa logró amplificar fragmento de ADN dentro de los límites esperados, de aproximadamente 250pb para el fragmento de la ADN polimerasa (Van de Vanter 1996), y de aproximadamente 120 pb para el fragmento del gen de la glicoproteína B (Burr y col. 1996), ambos resultados son congruentes con los autores que los desarrollaron.

La técnica de inmunofluorescencia, la cual emplea un conjugado policlonal en contra de CHV-1, mostró un marcaje fluorescente en el núcleo y la membrana citoplasmática, congruente con la evolución del ciclo viral, el cual se replica en el núcleo, donde adquiere las proteínas de nucleocápside y tegumento; mientras que las proteínas de envoltura las adquiere por medio de vesículas provenientes del aparato de Golgi (Maurer y col. 2008). El virus, al penetrar otra célula deja remanentes de su envoltura (incluyendo glicoproteínas) sobre la membrana celular (Spear 2004). Esto explica la localización del marcaje fluorescente. Cabe resaltar que el fabricante del reactivo utilizado para la inmunofluorescencia (VMRD®) menciona que tiene cierta reacción con el virus de distemper canino (CDV) y el virus de parainfluenza tipo 2 (CPI-2), por lo que no debe tomarse como único método diagnóstico, debe apoyarse de otras técnicas como la PCR para su confirmación. En este trabajo se utilizaron la microscopía electrónica y la PCR como apoyo al diagnóstico.

La partícula madura del herpesvirus consta de una nucleocápside que contiene el genoma viral y las proteínas asociadas (core), el tegumento que rodea la nucleocápside y la envoltura viral, la cual es derivada de la membrana de la célula del hospedero y en la que están incorporadas las glicoproteínas de membrana codificadas por el virus. Las fotografías obtenidas mediante MET

muestran dichas características, por lo que podemos presumir que se trata de herpesvirus.

Dado que su envoltura es relativamente flexible, la forma del virión no es siempre la misma y su diámetro estimado varía de 120 a 300 nm (Fields y col., 1996). En ella se encuentran los peplómeros, cuya función es la adsorción y la penetración en la célula hospedadora. En la envoltura se encuentran varias glicoproteínas, algunas encargadas de la adherencia y otras de la fusión. Además, en la envoltura se induce la producción de anticuerpos neutralizantes. Los resultados obtenidos en cuanto a estructura y tamaño coinciden con los presentados por autores como Roizman y Knipe (2001), que describen estas características a través de la microscopía electrónica de transmisión. Su cápside icosaédrica de 100 nm de diámetro está compuesta por 162 capsómeros de los cuales, 150 son hexagonales (hexámeros) y 12 son pentagonales (pentámeros). Alrededor de la cápside y bajo la envoltura se encuentra el tegumento, material amorfo a veces asimétrico (Wagner, 2003).

Serología

En México, debido a que no existían reportes de la presencia del virus, nunca se había realizado y reportado un estudio de epidemiología y seroprevalencia, por lo que este trabajo representa la primer evidencia serológica de la presencia del CHV-1 en la población en México, y fue realizada en perros de criadero, clínicamente sanos, de los cuales ninguno había sido inmunizado en contra de CHV-1.

Los resultados de la prueba de ELISA (EVL) muestran una seroprevalencia, dentro de los individuos muestreados, del 87%, la cual es alta, de acuerdo a las

reportadas en otros países (Lundgreen y Clapper 1969; Fulton y col. 1975; Bibrack 1976; Osterhaus y col. 1977; Delisle 1982; Engels 1980; Takumi y col. 1990; Poulet 1993; Seo y col. 1994 Rijsewijk y col. 1999; Lacheretz 1998; Ronsse y col. 2002; Guigal y col. 2002; Van Gucht y col. 2001; Góngora 2005; Dahlbom 2007; Nöthling y col. 2008; Engelbrecht 2009; Abuzer 2009; Babaei 2010; Yesilbag 2012; Musayeba 2013), pero es comparable con las reportadas por Reading y Field en 1998 que muestran un 88% de prevalencia en caninos particulares, con la publicada en Finlandia por Dahlbom en 2007 que muestra un 100% de prevalencia en caninos que presentaban problemas reproductivos, la de Avuzer en 2009 en Turquía con perros de la raza Kangal con un 71.8% y, la más comparable, Muyaseba en 2013 en Lituania quien reportó un 85%, muestreando, al igual que en éste trabajo, perros de criaderos.

Durante la evaluación estadística únicamente se encontró relación con el factor de raza y criadero, siendo la raza dependiente del criadero en que se muestreaba. Llama la atención que ninguno de los factores de presentación clínica (historial de haber presentado traqueobronquitis infecciosa, lesiones cutáneas u oculares, o de haber padecido problemas reproductivos) haya tenido una relación estadísticamente significativa con el título calculado.

Lo anterior permite suponer que la mayor parte de la población viral diseminada se encuentra en estado de latencia, o que las presentaciones clínicas se encuentren ocasionadas por otras etiologías.

Comparación de la técnica de ELISA (EVL™) con la técnica de seroneutralización.

La comparación entre ambas pruebas se realizó para poder tener un punto de referencia en cuanto a protección se refiere, es decir qué tanto funcionaría la prueba de ELISA para establecer si un canino se encuentra protegido o no. Al no tener muestras de las que se tenga certeza sean positivas o negativas, esta comparación no nos permitió establecer un parámetro de infección.

En este punto se debe tomar en cuenta que la prueba se basa en la detección de anticuerpos neutralizantes que surgen como respuesta protectora ante una infección viral, por lo que su función es detectar protección en el individuo. Sin embargo tiene ciertas limitantes, principalmente referentes a la gran subjetividad en la lectura de la prueba, disponibilidad de tiempo, altos costos en la obtención y mantenimiento de cultivos celulares, así como posibles contaminaciones no deseadas de ellos (Dinter 1989).

Las pruebas de ELISA, por su parte, han demostrado ser una herramienta efectiva para el diagnóstico de enfermedades, dadas sus múltiples ventajas, entre las cuales cabe destacar su automatización, estabilidad de sus reactivos, medición de los resultados en forma objetiva mediante equipos estandarizados, utilización de pequeñas cantidades de reactivos y bajo nivel de peligro biológico (Meléndez y col. 1987). Además resulta ser una prueba de diagnóstico rápida sobre un gran número de muestras y muy versátil pues puede utilizarse indistintamente en suero sanguíneo, plasma o leche (Dinter 1989).

Las desventajas que se le atribuyen a la prueba de ELISA se refieren principalmente a la posibilidad de reacciones inespecíficas, reactividad cruzada y sensibilidad a inhibidores de la actividad enzimática (Meléndez y col. 1987).

Para la comparación, se diseñó el modelo de regresión lineal, asociado a un análisis de varianza y al cálculo del coeficiente de correlación y el valor de R^2 .

Con el análisis de varianza se observó que ambos valores (título en ELISA y título en seroneutralización) están estadísticamente relacionados, es decir, siguen un modelo lineal. Sin embargo, el coeficiente de correlación indica una relación muy baja, por lo que la relación estadística carece de validez. Por su parte, la R^2 evidencia que únicamente el 21.4% de la variabilidad se puede explicar con el modelo. Este resultado indica una correlación muy baja entre ambas pruebas.

Además, se realizó el cálculo del coeficiente kappa para eliminar los resultados atribuibles al azar, con lo que se obtuvo un índice de concordancia del 0.1129, lo cual se clasifica como leve (de acuerdo a Landis y Koch en 1997). Esto es fácilmente explicable, ya que las dos pruebas, a pesar de medir anticuerpos, no detectan exactamente lo mismo. La técnica de seroneutralización detecta únicamente a los anticuerpos neutralizantes, los que interfieren con la infección viral directamente. Por su parte, la ELISA es capaz de distinguir anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes, por lo que tiene un repertorio más amplio de anticuerpos, así como anticuerpos que cruzan antigénicamente con otras proteínas, recordando que la prueba utilizada utiliza al virus completo. Sin embargo únicamente detecta inmunoglobulinas de la clase G. Además, el Herpesvirus canino es pobremente inmunogénico, y los anticuerpos específicos

contra el virus permanecen poco tiempo en altos títulos en la sangre (Carmichael y Grene 1998), por lo tanto, los ensayos de seroneutralización pueden fallar en detectar niveles bajos de anticuerpos. Takumi y sus colaboradores en 1990 desarrollaron la técnica de ELISA indirecta, detectando 26.2% de positividad, en contraste con un 5% mediante la técnica de neutralización en 557 perros.

En algunos trabajos se ha realizado el análisis de la reactividad serológica contra las glicoproteínas virales, encontrando actividad neutralizante principalmente en las gp 145/112 (gB), gp 80 (gC) y la gp 47 (gD) (Xuan y col. 1997).

Para lograr tener una comparación más práctica, se realizó un ejercicio donde se confrontaron las dos pruebas en cuanto a positividad o negatividad en los resultados, considerándose como positivos a ELISA los resultados con títulos calculados mayores a 100, mientras que en la seroneutralización se consideró a los resultados de título de 8 o mayores (Gerna y Chambers 1976).

Se realizó la tabla de contingencia para poder calcular los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, sin embargo debe tomarse en cuenta que dichos valores no son válidos para la prueba, ya que no se contaron con muestras verdaderamente positivas y negativas, únicamente se utilizó como un mecanismo de comparación. Con este ejercicio, se encontró un nivel de sensibilidad muy elevado, de 1; mientras que el nivel de especificidad de la prueba de ELISA, con respecto a la seroneutralización resultó ser de 0.154.

Una prueba diagnóstica de alta sensibilidad es útil en contextos clínicos donde el hecho de no diagnosticar la enfermedad (falsos negativos) genera más problemas que el exceso de diagnóstico (falsos positivos). Es el caso de tamizaje

o “*screening*”, que se realiza aplicando una prueba diagnóstica que otorgue resultados válidos y confiables, que sea de bajo costo, de fácil realización y mínima incomodidad para el usuario (Manterola 2009).

Estos conceptos de sensibilidad y especificidad permiten darle validez a una prueba diagnóstica, sin embargo carecen de utilidad en la práctica clínica, para esto se calcularon los valores predictivos positivo y negativo.

El valor predictivo positivo resultó ser del 39%, esto quiere decir que una muestra que es positiva mediante la prueba de ELISA tiene solo el 39% de probabilidad de resultar positiva mediante la prueba de seroneutralización.

Este valor es bajo, por lo que en un estudio clínico o epidemiológico si se obtiene un resultado positivo, este tendría que ser confirmado por la prueba de referencia (seroneutralización).

Por otra parte, el valor predictivo negativo resultó ser del 100% en este estudio, lo que indica que si una muestra resulta negativo bajo la prueba de ELISA, tiene el 100% de posibilidad de ser negativa bajo la prueba de referencia. Con este valor se tiene la confianza de que, en un estudio clínico o epidemiológico, un resultado negativo es realmente negativo.

De acuerdo a este ejercicio, la prueba de ELISA realizada en este trabajo es útil, para realizar un monitoreo (“*screening*”) de la población ya que un resultado positivo en esta prueba se requiere la confirmación con la prueba de seroneutralización, así mismo, un resultado negativo en ELISA indica una alta probabilidad de ser negativo en SN, por lo que ya no se requiere una confirmación con esta prueba, abatiendo enormemente los costos y el tiempo de diagnóstico.

Con la prueba de ELISA se observó una sensibilidad muy buena, pero la especificidad es baja, esto puede deberse al cruce antigénico o reacciones inespecíficas por parte de los anticuerpos. Además, la cantidad de anticuerpos no neutralizantes y neutralizantes, mayor a los que puede detectar la seroneutralización.

9. CONCLUSIONES.

- I. Se logró el aislamiento de cuatro cepas virales de CHV-1, así como su identificación por medio de reacción en cadena de la polimerasa, inmunofluorescencia directa y microscopía electrónica de transmisión.
- II. Se pudo establecer una relación entre las lesiones macroscópicas/microscópicas de la necropsia de cachorros que murieron dentro de los primeros 25 días, con la presencia de herpesvirus canino.
- III. Se obtuvo un 87% de positividad serológica de anticuerpos de la clase IgG (mediante la técnica de ELISA) contra CHV-1 en la población muestreada de 100 caninos de criaderos cercanos a la FES-C.
- IV. No se encontró una correlación significativa entre la técnica de ELISA y seroneutralización.

10. BIBLIOGRAFÍA.

- Abuzer, Acar., Sibel, Gur; Ismet, Dogan; Akca, Y., 2009. A serologic Investigation of Canine Herpesvirus Infection in Kangal Dogs. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8, pp.1377–1380.
- Alexander L., Denekamp L., Knapp A., Auerbach M. R., Damania B., D.R.C., 2000. The primary sequence of rhesus monkey rhadinovirus isolate 26–95: sequence similarities to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and rhesus monkey rhadinovirus isolate 17577. *J. Virol*, 74, pp.3388–3398.
- Appel J. G., Menegus M., Parsonson M., Carmichael L.E., 1969. Pathogenesis of canine herpesvirus in specific-pathogen-free dogs: 5- to 12-Week-Old Pups. *American Journal of Veterinary Research*, 30, pp.2067–2073.
- Arvin A., Campadelli-Fiume G., Mocarski E., Moore P.S., Roizman B., Whitley R., Yamanishi K., 2007. Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis. Cambridge: Cambridge University Press
- Aurelian, L., 1969. Herpesvirus : I . Synthesis of Replication of Canine Herpesvirus. , 4(3).
- Babaei, H. Akhtardanesh, B. Ghanbarpour, R., 2010. Serological evidence of canine herpesvirus-1 in dogs of Kerman city, south-east of Iran. *Transbound Emerg Dis*, 57(5), pp.348–351.
- Barrón R, Blanca; Cruz L, Miguel; Doval U, Rodolfo; Bañuelos G, Pedro; Guzman C, Hugo; Bayghen P, Esther; Ramírez H, Angel; Vales M, Noemí; Zavala G, J., 1989. *Manual de prácticas del laboratorio de virología* E. N. de C. B. IPN.
- Bibrack B, Schaudinn W., 1976. Untersuchungen über das vorkommen von herpesinfektionen bei hunden in der Bundesrepublik Deutschland mit hilfe eines neutralisations-schnelltest. *Veterinarmedizin Reihe B*, 23, pp.384–390.
- Borchers K., Field H.J., 1999. Neuronal latency in human and animal herpesvirus infections. *Curr Top Microbiol Immunol*, 253, pp.61–94.
- Burr P.D., Campbell M.E. , 1996. *Detection of canine herpesvirus 1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction.*,
- Carmichael L. E., Squire R. A., Krook L., 1965. Clinical and pathologic features of a fatal viral disease of newborn pups. *American Journal of Veterinary Research.*, 26, pp.803–814.
- Carmichael L., Barnes F. D., Percy H. D., 1969. Temperature as a factor of resistance of young puppies to canine herpesvirus. *Journal of Infectious Diseases*, 120, pp.669–678.

- Carmichael L.E., 1970. Herpesvirus canis: Aspects of pathogenesis and immune response. *Journal of the American Veterinary Medical Association.*, 156, pp.1714–1721.
- Carmichael L.E., Medic B.L., 1978. Small-plaque variant of canine herpesvirus with reduced pathogenicity for newborn pups. *Infection and immunity*, 20(1), pp.108–114.
- Chou J., Roizman B., 1989. Characterization of DNA sequence-common and sequence-specific proteins binding to cis-acting sites for cleavage of the terminal a sequence of the herpes simplex virus 1 genome. *J. Virol*, 63, pp.1059–1068.
- Chouljenko D. V., Kim I., Chouljenko V.N., Subramanian R., Walker J. D., Kousoulas K., 2012. Functional hierarchy of herpes simplex virus 1 viral glycoproteins in cytoplasmic virion envelopment and egress. *Journal of virology*, 86(8), pp.4262–70.
- Cohrs, R.J., Gilden, D., 2001. Human herpesvirus latency. *Brain Pathol*, 11, pp.465–474.
- Compton T., Kurt-Jones E. A., Boehme K. W., 2003. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J. Virol.*, 77(4588-4596).
- Dahlbom M., Johnsson M., Myllys V., Taponen J., 2007. Seroprevalence of Canine Herpesvirus-1 and *Brucella canis* in Finnish Breeding Kennels with and without Reproductive Problems. *Reproduction of Domestic Animals*, 44, pp.128–131.
- Davison A.J., Eberle R., Ehlers B., Hayward G.S., McGeoch D.J., Pellett P.E., Roizman B., Studdert M.J., Thiry E., 2009. The order Herpesvirales. *Arch Virol*, 154, pp.171–177.
- Day M.J., 2007. Immune system development in the dog and cat. *Journal of Comparative Pathology.*, 137, pp.s10–s15.
- Decaro N., Amorisco F., Desario C., Lorusso E., Camero M., Bellacicco A.L., Sciarretta R., Lucente M.S., Martella V., Buonavoglia C., 2010. Development and validation of a real-time PCR assay for specific and sensitive detection of canid herpesvirus 1. *Journal of Virological Methods*, 169(1), pp.176–180.
- Decaro N., Martella V., Buonavoglia C., 2008. Canine Adenoviruses and Herpesvirus. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 38(4), pp.799–814.
- Dinter Z., 1989. *Diagnostic Virology. A review of methods at the National Veterinary Institute. Coordinated research programme on animal disease diagnostics.*, Upsala, Sweden: National Veterinary Institute.
- Dubovi E.J., Maclachlan J.N., 2010. *Fenner's Veterinary Virology* 4th ed., Elsevier.

- Engelbrecht N., 2009. *Seroprevalensen af antistoffer mod Canin Herpesvirus 1 hos avlshunde i Østdanmark.*
- Engels M., Mayr-Bibrack B., Ruckstuhl B., Metzler A., 1980. Seroepizootiology of caninenherpesvirus in Switzerland and preliminary trials of a vaccine. *Veterinarmedizin Reihe B*, 27, pp.257–267.
- Erles, K., Dubovi E. J., Brooks H.W., 2004. Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, pp.4524–4529.
- Evermann J. F., Ledbetter E.C., Roger M., 2011. Canine reproductive, respiratory, and ocular diseases due to canine herpesvirus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 41, pp.1097–1120.
- Evermann J.F., Ledbetter E.C., Maes R.K., 2011. Canine Reproductive, Respiratory, and Ocular Diseases due to Canine Herpesvirus. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 41(6), pp.1097–1120.
- Field H.J., Biswas S., Mohammad I.T., 2006. Herpesvirus latency and therapy-- from a veterinary perspective. *Antiviral Res*, 71, pp.127–133.
- Fulton R.W., Ott R.L., Duenwald J.C., Gorham J., 1974. Serum antibodies against canine respiratory viruses: prevalence among dogs of eastern Washington. *American Journal of Veterinary Res*, 35, pp.853–855.
- Gacek R., 2002. The biology of neurotropic viruses. *Adv Otorhinolaryngol*, 60, pp.1–11.
- Gerna G., Chambers R., 1976. Varicella-Zoster Plaque Assay and Plaque Reduction Neutralization Test by the Immunoperoxidase Technique. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 4(5), pp.437–442.
- Góngora, V., 2005. *Evidencia serológica de la presencia del virus herpes canino en la provincia de Lima.*
- Greene C.E., 2012. *Canine Herpesvirus Infection*. 4th ed., Saunders.
- Grunewald K., Desai P., Winkler D. C., 2003. Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science*, 302, pp.1396–1398.
- Guigal P.M., Fontbonne A., Buff S., Vincetti M., Thévenet F., Pavlowicz S., Guiot A.L., Grandjean D., 2002. Prevalence of antibodies against Canine Herpes Virus in French breeding kennels. In *Proceedings of the third EVSSAR European Congress on Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory Animals*. p. 132.
- Hashimoto A., Hirai K., Okada K., Fujimoto Y., 1979. Pathology of the placenta and newborn pups with suspected intrauterine infection of canine herpesvirus. *American Journal of Veterinary Research* 1, 40, pp.1236–1240.

- Hashimoto A., Hirari K., Suzuki Y., Fujimoto Y., 1983. Experimental transplacental transmission of canine herpesvirus in pregnant bitches during the second trimester of gestation. *American Journal of Veterinary Research*, 44, pp.610–614.
- Hill H., Maré C.J., 1974. Genital disease in dogs caused by canine herpesvirus. *American Journal of Veterinary Research*, 35, pp.669–672.
- Hussein I.T., Field H.J., 2008. Development of a quantitative real-time TaqMan PCR assay for testing the susceptibility of feline herpesvirus-1 to antiviral compounds. *J Virol Methods*, 152, pp.85–90.
- Huxsoll D.L., Hemelt I.E., 1970. Clinical observation of canine herpesvirus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 156, pp.1706–1713.
- Isenberg G., 1998. *Modern Optics, Electronics and High Precision Techniques in Cell Biology*, Springer-Verlag.
- Jones C., 1998. Alphaherpesvirus latency: its role in disease and survival of the virus in nature. *Adv Virus Res*, 51, pp.9678–9688.
- Kieff E., Rickinson A.B., 2001. Epstein-Barr virus and its replication. *In Fields Virology*, pp. 2511-2574
- Kimberlin D., Lin W., Jacobs C., Dwight R. F., Corey A. P., Gruber L., 2001. Safety and efficacy of high-dose intravenous acyclovir in the management of neonatal herpes simplex virus infections. *PEDIATRICS*, 108, pp.230–238.
- Kirkbride, 2012. *Kirkbride's diagnosis of abortion and neonatal loss in animals*. 4th ed. B. L. Njaa, ed., Wiley-Blackwell.
- Kristie T.M., LeBowitz J.H., Sharp P.A., 1989. The octamer-binding proteins form multi-protein-DNA complexes with the HSV alpha TIF regulatory protein. *EMBO J*, 8, pp.4229–4238.
- Lacheretz A, Cognard .S., 1998. Epidémiologie et diagnostic sérologique de l'herpès virose canine. *Rev Me'd Ve't*, 143, pp.1477–1488.
- Larsen R.I.W., Agerholm J.S., 2013. Canine herpesvirus-1 infection in neonatal dogs. Veterinary master's thesis, Faculty of Health and Medical Science, University of Copenhagen.
- Ledbetter E.C., Dubovi E.J., Sung G., Maggs D., Bicalho R., 2009. Experimental primary ocular canine herpesvirus-1 infection in adult dogs. *American journal of veterinary research*, 70(4), pp.513–521.
- Ledbetter E.C., Kice N., Matusow R., Dubovi E.J., Kim S., 2010. The effect of topical ocular corticosteroid administration in dogs with experimentally induced latent canine herpesvirus-1 infection. *Experimental Eye Research*, 90(6), pp.711–717.

- Ledbetter E.C., Kim S.G., Dubovi E.J., 2009. Outbreak of ocular disease associated with naturally-acquired canine herpesvirus-1 infection in a closed domestic dog colony. *Veterinary Ophthalmology*, 12(4), pp.242–247.
- Ledbetter E.C., Kim S.G., Dubovi E.J., Bicalho C., 2009. Experimental reactivation of latent canine herpesvirus-1 and induction of recurrent ocular disease in adult dogs. *Veterinary Microbiology*, 138, pp.98–105.
- Love D.N., Huxtable C.R., 1976. Naturally-occurring neonatal canine herpesvirus infection. *The Veterinary Record*, 99, pp.501–503.
- Lundgren DL, Clapper W., 1969. Neutralization of canine herpesvirus by dog and human serums: a survey. *American Journal of Veterinary Res*, 30, pp.479–482.
- Maurer U.E., Zeev-ben-mordehai T., Pandurangan A., Cairns T., Hannah B., Whitbeck J.C., Eisenberg R.J., Cohen G.H., Topf M., Huiskonen J.T., 2009. The Structure of Herpesvirus Fusion Glycoprotein B- Bilayer Complex Reveals the Protein-Membrane and Lateral Protein-Protein Interaction. *Cell Structure*, 21, pp.1396–1405.
- McGavin M.D., Zachary J.D., 2007. *Pathological basis of veterinary disease* 4th ed. M. Elsevier, ed., St Louis Missouri: Elsevier.
- Mettenleiter T.C., 2006. Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: The herpesvirus assembly puzzle. In *Veterinary Microbiology*. pp. 163–169.
- Miyoshi M., Ishii Y., Takiguchi M., Takada A., Yasuda J., Hashimoto A., 1999. Detection of canine herpesvirus DNA in the ganglionic neurons and the lymph node lymphocytes of latently infected dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 61, pp.375–379.
- Montgomery D., 2004. *Diseño y análisis de experimentos* E. Limusa.
- Muranyi W., Haas J., Wagner M., Krohne G., K.U.H., 2002. Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science*, 297, pp.854–857.
- Newcomb W.W., Juhas R.M., Thomsen D.R., 2001. The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into herpes simplex virus capsid. *J.Virol.*, 75, pp. 10923-10932
- Nicola AV, Hou J, Major EO, S.S., 2005. Herpes simplex virus type 1 enters human epidermal keratinocytes, but not neurons, via a pH-dependent endocytic pathway. *J Virol*, 79, pp.7609–7616.
- Nöthling J.O., Hössy D., Steckler D., Ackermann M., 2008. Seroprevalence of canine herpesvirus in breeding kennels in the Gauteng Province of South Africa. *Theriogenology*, 69(3), pp.276–82.

- Ohmura Y., Ono E., Matsuura T., Kida H., Shimizu Y., 1993. Detection of feline herpesvirus 1 transcripts in trigeminal ganglia of latently infected cats. *Arch Virol*, 129, pp.341–347.
- Okuda Y., Hashimoto A., Yamaguchi T., Fukushi H., Mori S., Tani M., Hirari K., Carmichael L., 1993. Repeated canine herpesvirus (CHV) reactivation in dogs by an immunosuppressive drug. *The Cornell veterinarian*, 83(4), pp.291–302.
- Osterhaus A, Berghuis DE, Vries J., 1977. Antiviral antibodies in dogs in the Netherlands, *Zentralbl. Veterinarmedizin Reihe*, 24, pp.123–133.
- Percy D. H., Olander H.J., Carmichael L.E., 1968. Encephalitis in the newborn pup due to a canine herpesvirus. *Veterinary Pathology*, 5, pp.135–145.
- Percy D.H., Carmichael L.E., Albert D.M., King J.M., Jonas A.M., 1971. Lesions in puppies surviving infection with canine herpesvirus. *Veterinary pathology*, 8(1), pp.37–53.
- Poulet H., Bubourget P., 1993. L'herpès-virose canine. *Point Vétérinaire*, 25, pp.69–75.
- Poulet H., Guigal P.M., Soulier M., Leroy V., Fayert G., Minke J., Chappuis M., 2001. Protection of puppies against canine herpesvirus by vaccination of the dams. *The Veterinary record*, 148(22), pp.691–695.
- Preston C.M., Frame M.C., Campbell M. E., A complex formed between cell components and an HSV structural polypeptide binds to a viral immediate early gene regulatory DNA sequence. *Cell*, 52, pp.425-434.
- Reading M.J., Field H.J., 1998. A serological study of canine herpes virus-1 infection in the English dog population. *Archives of Virology*, 143(8), pp.1477–1488.
- Richardson J.A., 2000. Accidental ingestion of Acyclovir in dogs: 105 reports. *Veterinary and Human Toxicology*, 42, pp.370–371.
- Rijsewijk F.A.M., Luiten E.J., Daus F.J., Van der Heijden R.W., Van Oirschot J., 1999. Prevalence of antibodies against canine herpesvirus 1 in dogs in The Netherlands in 1997–1998. *Vet Microbiol*, 65(1-7).
- Rodes M.D., 2003. La importancia del herpesvirus en la reproducción. Información técnica Eurican Herpes 205. España. Merial.
- Roizman B., Baines J., 1991. The diversity and unity of Herpesviridae. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 14, pp.63–79.
- Roizmann B., Desrosiers R.C., Fleckenstein B., Lopez C., Minson A.C., Studdert M.J., 1992. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol*, 123, pp.425–449.

- Ronsse V., Verstegen J., Onclin K., Friederic F., Poulet H., 2004. Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1). *Theriogenology*, 61, pp.619–636.
- Ronsse V., Verstegen J., Onclin K., Guiot A.L., Aeberle' C., Nauwynck HJ., 2002. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in the Belgian dog population in 1997–1998. *Reprod Dom Anim*, 37, pp.299–304.
- Ronsse V., Verstegen J., Thiry E., Onclin K., Aeberlé C., Brunet S., Poulet H., 2005. Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. *Theriogenology*, 64(1), pp.61–74.
- Rootwelt V., Lund A., Krogenaes A., 2009. Herpes virus infection in the dog – A review . *Norsk Veterinærtidsskrift*, 121, pp.339–347.
- Ruyechan W. T., Peng H., Yang M., H.J., 2003. Cellular factors and IE62 activation of VZV promoters. *J. Med. Virol.*, 70, pp.90–94.
- Schwens A., Pastoret P.P., 1980. Fréquence de l'infection par le virus herpétique canin (canine herpesvirus 1) en Belgique. *Ann. Médecin Vétérinaire*, 124, pp.353–359.
- Seo L.B., Seong W.W., Lim C., 1994. Survey on the seroepidemiology of canine herpesvirus infection in Korea. *Korean Journal of Veterinary Res*, 34, pp.647–652.
- Simmons A., Slobedman B., Speck P., Arthur J., Efstathiou S., 1992. Two patterns of persistence of herpes simplex virus DNA sequences in the nervous systems of latently infected mice. *J Gen Virol*, 73, pp.1287–1291.
- Smith G. A., Gross S. P., E.L.W., 2001. Herpesviruses use bidirectional fast-axonal transport to spread in sensory neurons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98, pp.3466–3470.
- Spear P.G., 2004. Herpes simplex virus: Receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol*, 6, pp.401–410.
- Strandberg J.D., Aurelian L., 1969. Replication of canine herpesvirus. II. Virus development and release in infected dog kidney cells. *Journal of Virology*, 4(4), p.480-489
- Takumi A., Kusanagi K., Tuchiya K., Xuan X., Azetaka M., 1989. Serodiagnosis of canine herpesvirus infection-development of an enzyme-linked immunosorbent assay and its comparison with two improved methods of serum neutralization test. *Jpn J Vet Sci*, 52, pp.241–250.
- Townsend W.M., Stiles J., Guptill-Yoran L., Krohne S.G., 2004. Development of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay to detect feline herpesvirus-1 latency-associated transcripts in the trigeminal ganglia and corneas of cats that did not have clinical signs of ocular disease. *Am J Vet Res*, 65, pp.314–319.

- Van Gucht S., Nauwynck H., Pensaert M., 2001. Prevalence of canine herpesvirus in kennels and the possible association with fertility problems and neonatal death. *Diergeneeskd. Tijdschr*, 70, pp.204–211.
- VanDevanter D.R., Warrenner P., Bennett L., Schultz E.R., Coulter S., Garber R.L., Rose T.M., 1996. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *Journal of clinical microbiology*, 34, pp.1666–1671.
- Wagner M., Ruzsics Z., Koszinowski U.H., 2002. Herpesvirus genetics has come of age. *Trends in Microbiology*, 10(7), pp.318–324.
- Wright, N.G., Cornwell H.J., 1968. Experimental herpes virus infection in young puppies. *Research in Veterinary Science*, 9, pp.295–299.
- Xuan X., Horimoto T., Limcumpao J. A., Takumi A., Tohya Y., Takahashi E., Mikami T., 1991. Neutralizing determinants of canine herpesvirus as defined by monoclonal antibodies. *Arch Virol*, 116, pp.185–195.
- Xuan X., Horimoto T., Limcumpao J.A., Tohya Y., Takahashi E., Mikami T., 1992. Glycoprotein-specific immune response in canine herpesvirus infection. *Archives of Virology*, 122(3-4), pp.359–365.
- Xuan X., Kojima A., Murata T., Mikami T., Otsuka H., 1997. Analysis of canine herpesvirus gB, gC and gD expressed by a recombinant vaccinia virus. *Archives of Virology*, 142(5), pp.1003–1010.
- Xuan X., Maeda K., Tohya Y., Mikami T., Otsuka H., 1996. Identification and nucleotide sequence of the thymidine kinase gene of canine herpesvirus. *Virus genes*, 12(2), pp.185–188.
- Yesilbag K., Yalcin E., Tuncer P., 2012. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in Turkish dog population. *Res Vet Sci*, 92, pp.36–39.
- Zhou Z.H., Chen D.H., Jakana J., Rixon F.J., 1990. Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol*, 73 pp. 3210-3218