

# **UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**

*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*



**“Seroreactividad a Herpesvirus Canino tipo 1 en canes con antecedentes de problemas reproductivos provenientes de criaderos de Lima”**

Tesis para optar el Título Profesional de:  
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**Valeria Machuca Bandach**

**Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**LIMA - PERÚ**

**2020**

## **AGRADECIMIENTO**

- A mi familia que siempre será incondicional
- A mis perros que son mis fieles compañeros
- Al Dr. Luis Jara Salazar y a la Dra. Luisa Echevarría Cureé por su asesoría, respaldo y guía en la ejecución de este proyecto

## **ABSTRACT**

Canine Herpesvirus type 1 (CHV-1) is responsible for a fatal disease in newborn puppies and produces reproductive problems in dogs intended for breeding. The purpose of this study was to evaluate the frequency of seropositivity to CHV-1 in dogs with a history of reproductive problems such as infertility, embryonic reabsorption, abortions and stillbirths, originating from kennels in Lima. Forty serum samples were obtained during 2019 and analyzed by indirect ELISA test with the commercial kit "Canine Herpes Virus ELISA (XpressBio, USA.)" to detect the presence of anti CHV-1 antibodies. The frequency of antibodies found against CHV-1 in dogs with a history of reproductive problems in kennels in Los Olivos, Chorrillos, Lurín and Chilca, was 65% (26/40). 92.31 % corresponded to animals older than 18 months. The most reported reproductive problem was abortion, representing 53.84% and infertility with 15.38% . Also, 37.5% (9/24) of positive females were in estrus at the time of sampling. The present study reports for the first time a high frequency of exposure to CHV-1 in dogs with reproductive problems in kennels in Lima.

*Key words:* Canine Herpesvirus type 1, seropositivity, dogs, reproductive problems, kennels

## RESUMEN

El Herpesvirus canino tipo 1 (HVC-1) es responsable de una enfermedad mortal en cachorros recién nacidos y produce problemas reproductivos en canes destinados a la reproducción. El propósito de este estudio fue evaluar la frecuencia de seropositividad a HVC-1 en canes con antecedentes de problemas reproductivos como infertilidad, reabsorción embrionaria, abortos y mortinatos, provenientes de criaderos en Lima. Se obtuvieron 40 muestras de suero durante el 2019 y se analizaron mediante la prueba de ELISA indirecta con el kit comercial “Canine Herpes Virus ELISA (XpressBio, EEUU.” para detectar la presencia de anticuerpos anti HVC-1. La frecuencia de anticuerpos encontrada contra HVC-1 en canes con antecedentes de problemas reproductivos de criaderos en Los Olivos, Chorrillos, Lurín y Chilca, fue del 65% (26/40). El 92.31% correspondió a animales mayores de 18 meses. Los antecedentes reproductivos más reportados fueron aborto, representando el 53.84% e infertilidad con 15.38%. Asimismo, el 37.5% (9/24) de hembras positivas se encontraba en estro al momento de la toma de muestra. El presente estudio reporta por primera vez una frecuencia alta de exposición a HVC-1 en canes con problemas reproductivos de criaderos de Lima.

*Palabras clave:* Herpesvirus canino tipo 1, seropositividad, problemas reproductivos, criaderos

## INTRODUCCIÓN

En los últimos siglos, los canes han sido seleccionados para acompañamiento y apoyo de las necesidades y actividades humanas. Además, la popularidad de la especie como miembro de la familia ha aumentado, creando así nuevas oportunidades de negocio. En la actualidad, las instalaciones de cría van desde pequeños hasta grandes criadores que obtienen un gran número de camadas al año (Dendoncker *et al.*, 2019).

En el año 1965 en la ciudad de Nueva York (Estados Unidos), se aisló por primera vez el Herpesvirus canino tipo 1 (HVC-1) en neonatos de canes que tuvieron una muerte fulminante (Sykes, 2014). El virus en mención pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae* y ha sido reportado en todos los continentes, tanto en canes domésticos como salvajes (Evermann *et al.*, 1984). Es sensible a altas temperaturas, siendo su replicación óptima a 35-37 °C (Sykes, 2014). Asimismo, se sugiere que es latente en las neuronas del ganglio trigémino y nódulos linfáticos retrofaríngeos sin expresar un rango total de proteínas y sin producir una progenie total (Galossi, 2007; Nauwynck, 2010). La reactivación a su vez está asociada a períodos de estrés o inmunosupresión producida por una sobrepoblación de animales, hacinamiento, gestación y administración de corticoesteroides (Evermann *et al.*, 2011; Sykes, 2014).

El período de incubación del HVC-1 es de 6 a 10 días y se replica en las células epiteliales oronasales y de mucosa faríngea, en el tracto genital y ganglios linfáticos regionales (Sykes, 2014). Posteriormente, se difunde en el organismo a través de la sangre por medio de macrófagos hacia el hígado, riñones, pulmones y sistema nervioso central (Carmichael, 1999). Los signos de importancia en canes adultos son relacionados a la parte reproductiva,

mayormente problemas de fertilidad, reabsorciones embrionarias, abortos, mortinatos y lesiones papovesiculares genitales. Sin embargo, también es responsable de signos respiratorios como traqueobronquitis (Ronsse *et al.*, 2004; Evermann *et al.*, 2011; Rezaei *et al.*, 2020) y patologías oculares como blefaritis, conjuntivitis, queratitis ulcerativa y no ulcerativa (Ledbetter *et al.*, 2013).

El contagio se da por contacto venéreo, oronasal y en el caso de los neonatos también por vía transplacentaria (Ronsse *et al.*, 2004). Si una hembra se contagia durante la gestación, podría desarrollar una reabsorción embrionaria, momificación fetal, aborto, parto prematuro o neonatos pequeños que no lograrán sobrevivir en el tiempo (Greer, 2014). La enfermedad en neonatos dura de 1 a 3 días (Carmichael, 1999). Ésta se caracteriza por presentar hemorragias multifocales en distintos órganos como bazo, hígado, sistema gastrointestinal y cerebro, acompañada de signos clínicos que incluyen anorexia, disnea, dolor a la palpación abdominal, hipotermia, incoordinación, heces blandas amarillo verdosas, descarga nasal serosa o hemorrágica así como petequias en la mucosa y posteriormente la muerte (Poulet *et al.*, 2001; Ronsse *et al.*, 2004). Si los cachorros se contagian a la tercera semana de vida en adelante, desarrollarán una infección leve, subclínica o latente. Se sugiere que también pueden desarrollar signos neurológicos posteriormente (Sykes, 2014). La edad más vulnerable es del día 9 a 14 de edad (Greer, 2014). En animales adultos, existe la presencia de signos respiratorios como estornudos, descarga oculonasal serosa y queratitis por pocos días. Luego, permanecen como portadores asintomáticos en un período de latencia hasta que se reactive el virus por causas de inmunosupresión y estrés (Ronsse *et al.*, 2004).

En animales adultos, los hallazgos a la necropsia incluyen áreas de necrosis focal en el epitelio nasal, traqueal y bronquiolar que se extienden hasta los alveólos (Gadsden *et al.*, 2012). En neonatos, en los riñones se pueden encontrar petequias multifocales y necrosis. El hígado, pulmones, páncreas, ojos, cerebro, corazón, intestinos y glándulas adrenales también presentan

procesos de necrosis aguda (Percy *et al.*, 1971; Valdivia *et al.*, 2016; Piewbang *et al.*, 2017). Los hallazgos histopatológicos muestran cuerpos de inclusión viral intranucleares, nefrosis, congestión hepática difusa, neumonía y edema pulmonar (Sykes, 2014).

Dentro de las medidas preventivas y de control es importante que las hembras que van a ser utilizadas para reproducción sean vacunadas para que transmitan inmunidad pasiva a los neonatos a través del calostro (Nauwynck, 2010). Además, se debe aislar a las hembras gestantes, nunca antes expuestas al virus, 6 semanas antes del parto (Greco y Davidson, 2018). Si se conoce la presencia del virus, es necesario que se tenga almacenado suero con títulos altos de anticuerpos, obtenido de la hembra gestante al día 50. Al momento de nacer, se debe administrar a cada neonato 1 a 2 ml de suero por vía subcutánea o intraperitoneal dependiendo de la raza (tamaño) (Sykes, 2014; Greene y Ford, 2012). Al tratarse de un virus que se replica óptimamente por debajo de los 38°C, *se recomienda también elevar la temperatura de los neonatos artificialmente para evitar cuadros riesgosos de hipotermia* (Nauwynck, 2010). Mientras que los animales adultos seropositivos deben aislarse por el riesgo a actuar como reservorios del virus (Carmichael y Green, 2000). Posteriormente a una infección, debe establecerse un plan riguroso de desinfección de los ambientes expuestos (Galosi, 2007).

El diagnóstico de la enfermedad se basa en el aislamiento viral y se realiza a partir del material proveniente de órganos parenquimatosos obtenidos en la necropsia e hisopados genitales u oronasales (Rezaei *et al.*, 2020). A su vez se han utilizado técnicas de inmunofluorescencia directa, microscopia electrónica y PCR. También se realiza serología, test de seroneutralización, aglutinación y ELISA para detectar anticuerpos (Góngora, 2005).

A nivel mundial la prevalencia serológica del HVC-1 varía ampliamente, siendo 88% en Inglaterra, 80% en Noruega, 45.8% en Bélgica, 20.7% en Irán, 39.3% en Holanda, 6% en EEUU y 39.3% en Turquía (Papageorgiou, 2014). La mayor seroprevalencia se encuentra en criaderos, donde se sugiere que hay factores tanto ambientales como inmunológicos que hacen que los

títulos de anticuerpos aumenten. En Dinamarca se realizó un estudio para determinar la prevalencia de la infección por el virus en cachorros que murieron en las primeras tres semanas de vida, basándose en hallazgos post mortem, diagnosticando la infección en el 22.8% de los casos (Larsen *et al.*, 2015). Por otro lado, en Noruega el 85,5% de las hembras analizadas tenían títulos de anticuerpos mayores a 80 y se clasificaron como positivas (Krogenaes *et al.*, 2014). Dahlbom *et al.*, (2009), realizaron un estudio de seroprevalencia en criaderos de Finlandia encontrando que el 100% de los canes de 32 criaderos con problemas reproductivos fueron seropositivos.

En América del Sur, la prevalencia no se tiene muy clara. En Chile se logró realizar un estudio en donde se aisló y caracterizó el virus en neonatos fallecidos con enfermedad hemorrágica, confirmando así la presencia del virus en el país (Navarro *et al.*, 2003). En el mismo país, Fuentes (2010) realizó la determinación del gen UL37 del virus mediante PCR y logró determinar que la concentración viral mínima detectable por la prueba fue de 0,00079 DICT50 (dosis infectiva de cultivo celular), lo cual representaría alta sensibilidad de la técnica. En el Perú, un único estudio en Lima Metropolitana fue realizado por Góngora (2005) en 28 canes sin ser provenientes de criaderos pero con antecedentes reproductivos como aborto, mortalidad neonatal, infertilidad, reabsorción embrionaria, animales provenientes de madres que tuvieron algún episodio abortivo y sobrevivientes de camadas con alta mortalidad, encontró un 32% de animales seropositivos para HVC-1.

En ese contexto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia de anticuerpos anti HVC-1 mediante la técnica de ELISA indirecta, en canes con antecedentes de problemas reproductivos provenientes de criaderos de Lima.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **1. Lugar de estudio**

El presente estudio se desarrolló a partir de 9 criaderos formales de canes de Lima, provenientes de los distritos de Los Olivos, Chorrillos, Lurín y Chilca. El muestreo se realizó en los meses de abril, mayo y junio del año 2019. Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

## **2. Tamaño de muestra**

El tamaño de muestra fue determinado mediante la fórmula de estimación de una proporción para una población de tamaño desconocido (Aguilar-Barojas, 2005), obteniendo como tamaño mínimo 38 canes en base a una frecuencia previa reportada del 32% (Góngora 2005) con un nivel de confianza de 95% y un margen de error de 15%. Como criterio de inclusión se consideraron únicamente canes de 6 meses hasta 10 años de edad con al menos un antecedente reproductivo durante su vida, tales como: infertilidad, hembras con reabsorciones embrionarias, hembras con abortos, hembras con crías mortinatos, animales provenientes de madres que tuvieron un episodio abortivo y animales sobrevivientes de camadas con mortalidad. Además, los animales no tenían antecedentes de vacunación contra HVC-1.

### **3. Colección de muestras**

Antes de la toma de muestra, se realizó la anamnesis y examen clínico de cada can. La información se registró en fichas que incluían una codificación, con datos de la edad, raza, sexo, tipo de alimentación, vacunas, desparasitaciones y antecedentes de problemas reproductivos.

Por medio de punción aséptica de la vena cefálica se colectó 3 ml de sangre en tubos sin anticoagulante. El transporte de las muestras fue a temperatura ambiente (20-25 °C) en el transcurso de una hora, mantenidas de forma vertical en plano inclinado dentro de un cooler hacia el laboratorio. La centrifugación de las mismas fue a 2500 rpm por 10 minutos. Se obtuvo el suero y se almacenó en alícuotas en crioviales a -20°C hasta su uso (dentro del mismo año de colección de las muestras) para la técnica de ELISA indirecta. El procesamiento y técnicas de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

### **4. Procesamiento de las muestras**

Las muestras de suero se descongelaron dentro del laboratorio a temperatura ambiente (20-25°C) y se analizaron mediante la técnica de ELISA indirecta cualitativa para detectar anticuerpos frente HVC-1 en suero, según el protocolo del kit comercial “Canine Herpes Virus ELISA” (XpressBio, EEUU).

El primer paso consistió en realizar una dilución de 1:50 de cada suero con el buffer 1X del kit (5 µl de suero en 245 µl de diluyente) en un microtubo de 1.5 ml. Para cada muestra se utilizó un pocillo tapizado y sin tapizar con antígeno del virus dentro de la microplaca proveída por el kit, en donde se colocó 100 µl de cada suero previamente diluido. Además, se incluyó un suero control positivo y negativo frente a antígeno de HVC-1 en el pocillo con y sin tapizar, los cuales fueron proveídos por el mismo kit. Se cubrieron los pocillos con una lámina de sellado para placa y se incubaron a 37 ° C durante 45 minutos. Después de la incubación, se lavó cada pocillo cinco

veces con la solución de lavado proveída por el kit. Posteriormente se colocó 100 µl de conjugado con peroxidasa proveído por el kit en cada pocillo. Seguidamente, la placa se incubó a 37 ° C durante 45 minutos. Después, se lavó de igual forma como lo descrito anteriormente. Se colocó luego 100 ul del substrato de peroxidasa y cromógeno ABTS en cada pocillo. Por último, se incubó la placa a temperatura ambiente (20 - 25° C) durante 30 minutos. Al termino de la última incubación, se registraron las densidades ópticas de la reacción colorimétrica a una longitud de onda de 405 nm en un espectrofotómetro (ELx800, Biotek, EEUU), mediante el software Gen 5 versión 2.04 (Biotek, EEUU).

Para validar la corrida se restó el valor resultante de densidad óptica del pocillo antigenado del control negativo menos el del pocillo no antigenado del mismo, de tal forma que resultara  $\leq 0.250$  y se realizó lo mismo para el control positivo con un valor de  $\geq 0.600$ . Una muestra se consideró positiva según los siguientes criterios de acuerdo al fabricante: si la diferencia entre la absorbancia de la muestra en el pocillo con el antígeno viral y la absorbancia de la misma muestra en el pocillo sin el antígeno viral resultó  $\geq 0.300$ .

## **1. Plan de análisis de datos**

Los resultados se colocaron en tablas de frecuencia y se utilizó estadística descriptiva para los mismos. Se evaluó además la correlación de la edad de los animales positivos con la seropositividad expresada en densidad óptica mediante la prueba de Pearson. El nivel de significancia fue de 0.05 y los datos se analizaron con el programa IBM SPSS Statistics 25.0.

## RESULTADOS

La frecuencia de seroreactividad frente a HVC-1 en canes con antecedentes de problemas reproductivos provenientes de criaderos en Los Olivos, Chorrillos, Lurín y Chilca, fue de 65% (26/40).

De los resultados según la variable sexo, el 92.3% (24/26) de los animales seropositivos correspondió a hembras y el 7.7% (2/26) a machos. Con respecto a las razas, el American staffordshire terrier fue la raza registrada con mayor número de seroreactores, representando el 30.77% de los canes positivos (8/26). La segunda raza correspondió al American Bully con 15.38% (4/26), seguido por el Bulldog inglés, Bulldog francés y Bull terrier que tuvieron una misma seroprevalencia del 11.54% (3/26). La raza Boxer tuvo una frecuencia del 7.69% (2/26), mientras que para el Pastor alemán, Rottweiler y Schnauzer miniatura fue del 3.85% (1/26) cada uno.

Según grupo etáreo, los canes adultos (mayores a 18 meses y menores de 8 años) presentaron la mayor cantidad de seroreactores frente a HVC-1, representando el 92.31% (24/26). El 7.69% restante perteneció a canes mayores de 8 años. Ningún can menor a 18 meses resultó positivo (Cuadro 1). La correlación entre la intensidad de la seropositividad (densidad óptica) y la edad de los animales resultó positiva pero con un coeficiente bajo de 0.1327, no significativo.

Cuadro 1.- Distribución de canes seroreactores frente a HVC-1 con antecedentes de problemas reproductivos según grupo etáreo

Grupo etáreo	N° de animales muestreados	Seroreactores frente a HVC-1	
		(+)	%
6 – 9 meses	3	0	0
9 – 18 meses	3	0	0
18 – 96 meses	31	24	92.31
Mayores a 96 meses	3	2	7.69
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>26</b>	<b>100%</b>

En relación a la presencia de anticuerpos contra HVC-1 y tipo de antecedente reproductivo el 53.84% (14/26) de los canes positivos tuvo antecedente de aborto, el 15.38% (4/26) infertilidad, el 11.54% (3/26) mortinatos, el 3.85% (1/26) reabsorción embrionaria, el 11.54% (3/26) infertilidad y reabsorción embrionaria y el 3.85% (1/26) restante infertilidad, aborto y mortinatos (Cuadro 2).

Cuadro 2.- Frecuencia de canes seroreactores frente a HVC-1 según tipo de problema reproductivo registrado

Problema reproductivo	Seroreactores frente a HVC-1	
	N° de animales	Frecuencia (%)
Aborto	14	53.84
Infertilidad	4	15.38
Mortinatos	3	11.54
Reabsorción embrionaria	1	3.85
Reabsorción embrionaria e infertilidad	3	11.54
Infertilidad, aborto y mortinatos	1	3.85
<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>100%</b>

Por último, el 37.5% (9/24) de hembras positivas se encontraba en estro al momento de la toma de muestra.

## DISCUSIÓN

La primera y única evidencia registrada de exposición a HVC-1 en Lima-Perú fue reportada por Góngora (2005). Por medio de la prueba de inmunofluorescencia indirecta obtuvieron 32% de animales seropositivos, los cuales tenían algún antecedente de problema reproductivo como aborto, mortalidad neonatal, infertilidad o reabsorción embrionaria, animales provenientes de madres que tuvieron algún episodio abortivo, sobrevivientes de camadas con alta mortalidad y en el caso de los machos, que hayan sido cruzados con hembras con alguno de los antecedentes mencionados. Sin embargo, no tomaron en consideración animales provenientes de criaderos ya que 11 de los 28 animales que incluyeron en su estudio eran mestizos.

Los animales provenientes de criaderos son de raza pura (con registro genealógico) y podrían estar más expuestos a distintos virus y agentes infecciosos ya que hay mayor interacción entre individuos en situaciones de riesgo como montas naturales, exposición a restos placentarios, hembras en celo y descargas vulvares, exposición a cachorros posiblemente infectados o vulnerables, entre otros factores (Ronsee *et al.*, 2004). Sin embargo, la raza no es un factor que influye en una mayor seropositividad en los canes (Ronsee *et al.*, 2004; Evermann, 2005). Al considerar animales de criaderos se estarían evaluando poblaciones en riesgo y es posible encontrar un mayor número de animales seropositivos a HVC-1. Van Gucht *et al.* (2001), realizaron un estudio para determinar la seroprevalencia en criaderos de Bélgica, demostrando relación significativa entre una alta seroprevalencia con los casos de mortalidad neonatal y complicaciones para conseguir que las hembras queden preñadas. Asimismo, indicaron que la seropositividad de los canes es mayor en criaderos. La seroprevalencia de HVC-1 en canes provenientes de criaderos ha sido reportada por diversos autores, por ejemplo Van Gucht *et al.*

(2001) en Bélgica con de 49.5%, Valdivia *et al.* (2016) en México con 87%, Krogenaes *et al.* (2014) en Noruega con 85.5% y Musayeva *et al.* (2013) en Lituania con 85%. Datos que sugieren que la exposición al virus es alta y distribuida a nivel mundial. La serofrecuencia hallada en el presente estudio es alta a pesar de no representar un número elevado de animales muestreados, aunque dirigida sólo a canes con antecedentes de problemas reproductivos.

Debido a que todos los animales incluidos en el presente estudio tenían antecedentes de problemas reproductivos, no debería descartarse que el 35% seronegativo pueda deberse a otros agentes infecciosos. Existen diversas agentes infecciosos que ocasionan los problemas reproductivos mencionados, entre ellas *Brucella canis*, *Mycoplasma/Ureaplasma*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, entre otros (Givens y Marley, 2008). Un estudio realizado por Ramírez *et al.*, (2006) reportó una seroprevalencia del 15.6% de brucelosis canina en la provincia constitucional del Callao con una tasa mayor en canes con antecedentes reproductivos. Asimismo, también existen causas no infecciosas como hipoluteoidismo, estrés, deficiencias nutricionales, entre otras (Verstegen., *et al* 2008), de manera que es importante encontrar la causa real del problema.

Se debe considerar que en un estado de latencia, el virus puede reactivarse, sobre todo con mayor frecuencia cuando las hembras están en celo y al momento del parto (Anvik, 1991). Es por eso que los estudios serológicos pueden determinar si el animal ha estado expuesto al virus pero no puede identificar si está enfermo o diseminando el agente en ese momento (Yapici *et al.*, 2018). En el presente estudio, solo 34.3% de las hembras que participaron se encontraban en proestro o estro. Ronsee *et al.* (2004), reportaron fluctuaciones en los títulos de anticuerpos anti HVC-1 con respecto a la etapa del ciclo estral, encontrando títulos más elevados en estro con respecto al diestro. Asimismo, Ronsse *et al.* (2005) realizaron un estudio en donde evaluaron un ciclo completo en hembras de criaderos, reportando que las que inicialmente fueron seronegativas se convirtieron a seropositivas a lo largo del estudio, además el 60% de las hembras seropositivas mantuvo su condición mientras que el 40% se convirtieron seronegativas

en una o dos ocasiones. Este hallazgo sugiere que la reactivación del virus es posible e independiente por animal, asociándose posiblemente a factores de estrés o inmunosupresión (Okuda *et al.*, 1993; Greene y Ford, 2012; Sykes, 2014).

Existen diversos estudios que evalúan la seroprevalencia de HVC-1 en canes provenientes de criaderos y su relación con la edad. Krogenaes *et al.* (2014) no encontraron asociación entre la seropositividad de los animales con la edad. Sin embargo, el mismo autor en un estudio previo en el año 2012, obtuvo una seroprevalencia de 80% con una tendencia, aunque no significativa, de aumentar el valor del título de anticuerpos con respecto a una mayor edad de los animales. En el estudio del año 2012, la variación de las edades de los animales muestreados fue menor por lo que eso podría explicar que no hayan encontrado una asociación entre una mayor seroprevalencia con respecto a una mayor edad de los animales. Esta asociación la relacionan a una mayor exposición al virus ya que son animales que ingresan a una etapa reproductiva constante. Ronsse *et al.*, (2004), encontraron que los animales tienen una seroconversión positiva a manera que aumenta su edad. En nuestro estudio, se encontró una correlación positiva entre la intensidad de la seropositividad a HVC-1 y la edad de los animales, más no fue significativa y que podría deberse a un bajo número de muestra y a que las edades no fueron heterogéneas en cantidad.

En cuanto a los machos seropositivos, en nuestro estudio tuvieron como antecedente reproductivo infertilidad y además fueron cruzados con hembras seropositivas pertenecientes al estudio. Este hallazgo podría representar un potencial riesgo de transmisión venérea del virus. Ningún animal del grupo etéreo correspondiente a cachorros y jóvenes resultó seropositivo. Estos resultados coinciden con Krogenaes *et al.* (2014) donde no encontraron ningún animal seropositivo menor a 12 meses, además Ronsse *et al.* (2004) no encontraron ningún animal seropositivo menor a 6 meses de edad. Se sugiere que esto podría deberse a un menor tiempo de exposición al virus ya que los animales de esa edad todavía no han iniciado su etapa reproductiva que es a partir de los 18 meses en promedio (Ronsse *et al.*, 2004).

Con respecto a las técnicas diagnósticas existen diversas que pueden ser utilizadas dependiendo de la practicidad y disponibilidad de materiales y equipos. Por ejemplo, la seroneutralización viral consiste en cuantificar e identificar la capacidad de respuesta de los anticuerpos para inhibir o neutralizar el efecto del patógeno en un cultivo celular, teniendo como limitante el no poder detectar títulos bajos de anticuerpos ni animales que estén diseminando el agente en ese momento. Por otro lado, la técnica de ELISA indirecta permite la cuantificación de títulos bajos de anticuerpos que no son detectables por otras técnicas, además de ser una técnica rápida, no obstante solo detecta exposición más no si existe enfermedad actual (Reinhardt *et al.*, 2001). Al presentar ventajas prácticas y ser más sensible que otras pruebas serológicas, el ELISA se considera uno de los métodos de elección para la detección de anticuerpos contra el HCV-1 (Reading y Field, 1998). Asimismo, la técnica se ha comparado con el test de seroneutralización viral, concluyendo que el método de ELISA es capaz de detectar un mayor número de animales seropositivos en virtud a su mayor sensibilidad diagnóstica, resultando ser un método apto para el diagnóstico serológico de grandes poblaciones animales (Reinhardt *et al.*, 2001). El aislamiento viral es una técnica más compleja y laboriosa y su eficacia depende de una oportuna toma de muestra, transporte y procesamiento de la misma (Crespo, 2000). Por otro lado, la técnica molecular de PCR es capaz de detectar mínimas cantidades de ADN viral, pero solo en el caso de que el animal se encuentre enfermo al momento del muestreo, además de ser más costosa y requerir mayor equipamiento y experticia (Fuentes, 2010).

Se sugiere que la toma de muestra de las hembras debe ser en estro o post parto (o aborto) para evaluar exposición al virus. Esto fue una limitante en el presente estudio ya que no todas las que participaron cumplieron con lo mencionado, además de tener un número de muestra pequeño. Asimismo, se deberían realizar estudios en donde también se descarten otros agentes infecciosos en simultáneo como por ejemplo *B. canis*. Para obtener resultados más precisos, teniendo en cuenta que el virus puede ser latente y reactivarse, habría sido necesario evaluar la seroprevalencia para HVC-1 durante un ciclo reproductivo completo de cada hembra, ya que así

se tendría mayor posibilidad de detectar a los verdaderos seropositivos y aquellos que seroconvierten en alguna fase del ciclo.

El presente estudio muestra por primera vez evidencia de seroreactividad de HVC-1 en canes provenientes de criaderos de Lima. Los hallazgos encontrados demuestran una exposición alta al virus tanto en machos como en hembras con antecedentes de problemas reproductivos, por lo cuál se sugiere tomar en consideración medidas de manejo, control y prevención. Asimismo, es importante aislar y caracterizar el virus además de muestrear una mayor población de animales de otros criaderos ya que existe un aumento de la cinofilia en nuestro país con el paso de los años.

Al no vacunarse animales contra HVC-1 de forma rutinaria, la técnica de ELISA podría emplearse para monitorear la exposición al virus en hembras que no preñen y/o presenten otros problemas reproductivos, de igual forma como herramienta de cribado para el ingreso de nuevos animales al criadero, antes de realizar el cruce, entre otras aplicaciones.

## **CONCLUSIONES**

- La frecuencia de seroreactividad frente a HVC-1 en canes con antecedentes de problemas reproductivos de criaderos en Lima fue alta con más del 50%.
- Los canes seroreactores a HVC-1 tuvieron una mayor frecuencia de aborto e infertilidad dentro de sus antecedentes.

## RECOMENDACIONES

- Realizar el descarte de otros agentes infecciosos diferentes a Herpesvirus canino tipo 1 en canes que presenten problemas reproductivos.
- Evaluar la seroreactividad a Herpesvirus tipo 1 en más criaderos de canes con un mayor número de muestras y en el caso de hembras durante un ciclo estral completo.
- Aislar y caracterizar el Herpesvirus canino tipo 1 a partir de lesiones asociadas a problemas reproductivos en canes.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Barojas S. 2005. Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. *Salud Tab.* 11(1): 333-338.
- Anvik J. 1991. Clinical considerations of canine herpesvirus infection. *Vet Med.* 86(4):394-403.
- Carmichael L. 1999. Neonatal viral infections of pups: canine herpesvirus and minute virus of canines (canine parvovirus-1). *Recent Advances in Canine Infectious Diseases.* IVIS.
- Carmichael L, Greene C. 2000. Infección por herpesvirus canino. En *Enfermedades infecciosas en perros y gatos.* 2a ed. México. 31-36.
- Crespo M. 2000. El diagnóstico viral por el laboratorio. *Col Med.* 31(3): 135-150.
- Dahlbom M, Johnsson M, Myllys V, Taponen J, Andersson M. 2009. Seroprevalence of Canine Herpesvirus-1 and *Brucella canis* in Finnish Breeding Kennels with and without Reproductive Problems. *Repro Domest Anim.* 44(1):128–131.
- Dendoncker P-A, De Keuster T, Diederich C, Dewulf J, Moons C. 2019. On the origin of puppies: breeding and selling procedures relevant for canine behavioural development. *Vet Rec.* 184(23):710.
- Evermann JF, LeaMaster B, McElwain T, Potter K, McKeirnan A, Green J. 1984. Natural infection of captive coyote pups with a herpesvirus antigenically related to canine herpesvirus. *J Am Vet Med Assoc.* 185(11):1288-1290.
- Evermann JF. 2005. Canine herpesvirus infection: Update on risk factors and control measures. *Vet Forum.* (69):32–7.
- Evermann JF, Ledbetter E, Maes R. 2011. Canine reproductive, respiratory, and ocular diseases due to canine herpesvirus, *Vet. Clin.* 41(6):1097–1120.
- Fuentes, A. 2010. Determinación del gen ul37 del virus herpes canino mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Tesis de Titulación. Santiago: Universidad de Chile. p 56.

- Gadsden B, Maes R, Wise A, Kiupel M, Langohr I. 2012. Fatal Canid Herpesvirus 1 infection in an adult dog. *J Vet Diagn Invest.* 24(4): 604-607.
- Galosi CM. 2007. Herpesvirus canino 1: agente etiológico y enfermedad. *Analecta vet.* 27(2): 28-35.
- Góngora, V. 2005. Evidencia Serológica de la Presencia del Virus Herpes Canino en la Provincia de Lima. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 38 p.
- Givens D, Marley M. 2008. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology.* 70(3): 270-285.
- Greene C, Ford R. 2012. Canine Herpesvirus Infection. *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* Misuri, Estados Unidos: Elsevier. 48-65.
- Greco D, Davidson A. 2018. La consulta veterinaria en 5 minutos de Blackwell: manual clínico: Endocrinología y reproducción en pequeños animales. Argentina. Inter médica. p 49.
- Greer, M. 2014. Neonatal and Pediatric care. *Canine Reproduction and Neonatology.* Wyoming, Estados Unidos: Teton Newmedia. 139-215.
- Krogenaes A, Rootwelt V, Larsen S, Renstrom L, Farstad W, Lund A. 2014. A serological study of canine herpesvirus-1 infection in a population of breeding bitches in Norway. *BioMed Central* (3): 4-19.
- Larsen R, Kiupel M, Balzer H, Agerholm J. 2015. Prevalence of canid herpesvirus-1 infection in stillborn and dead neonatal puppies in Denmark. *BioMed Central.* (4): 56-64.
- Ledbetter E, Dubovi E, Kim S, Maggs D, Bicalho. 2009. Experimental primary ocular canine herpesvirus-1 infection in adult dogs. *Am J Vet Res.* (6):740.
- Malone E.K, Ledbetter E.C., Rassnick K.M., Kim S.G., Russell D. 2010. Disseminated Canine Herpesvirus-1 Infection in an Immunocompromised Adult Dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine,* (24): 965-968.

- Musayeva K, Sengaut J, Petkevicius S, Malakauskas A, Gerulis G, Salomskas A. 2013. Seroprevalence of canine Herpesvirus in lithuanian dog population. *Vet Med Zoot.* 61(83): 48-52.
- Navarro C, Celedón M, Pizarro J. 2003. Detección de virus herpes canino tipo 1 en Chile. *Arch med vet.* 35(2): 227-231.
- Nauwynck H. 2010. Canine herpes virus 1-infections in dogs: truth and lies. EVSSAR Congress, 7th, Proceedings. European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR). p 47-49.
- Okuda Y, Ishida K, Hashimoto A, Yanaguchi T, Fukushi H Hirai K, Carmichael L. 1993. Virus reactivation in bitches with a medical history of herpesvirus infection. *Am J Vet Res.* (54): 551-554.
- Papageorgiou K, Suarez N, Wilkie G, McDonald M, Graham E, Davison A. 2014. Genome Sequence of Canine Herpesvirus. *Plos One.* 5: 16-25.
- Percy D, Carmichael L, Albert D, King J, Jonas A. 1971. Lesions in Puppies Surviving Infection with Canine Herpesvirus. *Vet Path.* (8): 37-53.
- Piewbang C, Rungsipipat A, Poovorawan Y, Techangamsuwan S. 2017. Viral molecular and pathological investigations of Canid Herpesvirus 1 infection associated respiratory disease and acute death in dogs. *Acta Vet-Beograd.* 67(1): 11-24.
- Poulet H, Guigal P, Soulier M, Leroy V, Fayet G, Minke J, Chappuis Merial G. 2001. Protection of puppies against canine herpesvirus by vaccination of the dams. *Vet Rec,* 148(22):691–695.
- Ramirez H, Calle S, Echevarría L, Morales S. 2006. Prevalencia de brucelosis canina en dos distritos de la Provincia Constitucional del Callao. *Rev Investing Vet.* 17(1).
- Reading M, Field M. 1998. A serological study of canine herpesvirus-1 infection in the english dog population. *Arch virol* (143): 1477-1478.
- Reinhardt G, Carrasco L, Tadich N, Riedemann S. 2001. Comparison of two diagnostic techniques to bovine viral diarrhoea disease (BVD) in 50 dairy herds from the Xth Region, Chile.

- Seroneutralization test and indirect immunosorbent assay (I-ELISA). *Arch Med Vet.* 33(2): 173-183.
- Rezaei M, Jajarmi M, Alizadeh R, Khalili M, Babaei H. 2020. First molecular study of Canine Herpesvirus-1 in reproductive specimens of adult dogs in southeast of Iran. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 17: 101487
  - Ronsse V, Verstegen J, Onclin K, Farnir F, Poulet H. 2004. Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1). *Theriogenology.* 61(4):619-36.
  - Ronsse V, Verstegen J, Thiry E, Onclin K, Aeberlé C, Brunet S. 2005. Canine Herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. *Theriogenology.* 64(1): 61-74.
  - Sykes, J. 2014. Canine Herpesvirus Infection. Davidson, A. *Canine and Feline infectious diseases.* California, Estados Unidos: Elsevier. 166-169.
  - Valdivia E, Ángeles J, Cuenca C, Montaraz J, Marín L, Del río J, Valdivia G. 2016. Canine herpesvirus seroprevalence and associated factors in dogs of Mexico. *Open J Vet Med.* 6(10): 14.
  - Van Gucht S, Nauwynck H, Pensaert M. 2001. Prevalence of canine herpesvirus in kennels and the possible association with fertility problems and neonatal death. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift.* 70(3): 204-211.
  - Ramirez H, Calle S, Echevarría L, Morales S. 2006. Prevalencia de brucelosis canina en dos distritos de la Provincia Constitucional del Callao. *Rev Investing Vet.* 17(1).
  - Reading M, Field M. 1998. A serological study of canine herpesvirus-1 infection in the english dog population. *Arch virol* (143): 1477-1478.
  - Reinhardt G, Carrasco L, Tadich N, Riedemann S. 2001. Comparison of two diagnostic techniques to bovine viral diarrhoea disease (BVD) in 50 dairy herds from the Xth Region, Chile. Seroneutralization test and indirect immunosorbent assay (I-ELISA). *Arch Med Vet.* 33(2): 173-183.

- Rezaei M, Jajarmi M, Alizadeh R, Khalili M, Babaei H. 2020. First molecular study of Canine Herpesvirus-1 in reproductive specimens of adult dogs in southeast of Iran. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 17: 101487
- Ronsse V, Verstegen J, Onclin K, Farnir F, Poulet H. 2004. Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1). *Theriogenology.* 61(4):619-36.
- Ronsse V, Verstegen J, Thiry E, Onclin K, Aeberlé C, Brunet S. 2005. Canine Herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. *Theriogenology.* 64(1): 61-74.
- Sykes, J. 2014. Canine Herpesvirus Infection. Davidson, A. *Canine and Feline infectious diseases.* California, Estados Unidos: Elsevier. 166-169.
- Valdivia E, Ángeles J, Cuenca C, Montaraz J, Marín L, Del río J, Valdivia G. 2016. Canine herpesvirus seroprevalence and associated factors in dogs of Mexico. *Open J Vet Med.* 6(10): 14.
- Van Gucht S, Nauwynck H, Pensaert M. 2001. Prevalence of canine herpesvirus in kennels and the possible association with fertility problems and neonatal death. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift.* 70(3): 204-211.
- Verstegen J, Dhaliwal G, Verstegen-Onclin K. 2008. Canine and feline pregnancy loss due to viral and non-infectious causes: A review. *Theriogenology.* (70): 304-319.
- Yapici O, Avci O, Levent O, Hasircioglu S. 2018. Detection of canine Herpesvirus infection on dogs. *Microbiol Res J Int.* 24(1): 1-6.