



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Título:

Evaluación de la aplicación de un ensayo de PCR para la detección de material genético de Herpesvirus canino tipo 1 en muestras clínicas de caninos.

Tesis de Grado, previa a la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista.

AUTORES:

Andrés Alberto Reyes Zumba. C.I: 0302861240

Joaquin Alberto Macancela Oña. C.I: 0105802359

DIRECTOR:

Dr. Teófilo Estuardo Palacios Ordóñez C.I: 0101330579

CODIRECTOR:

Dr. Antonio Javier Vallecillo Maza, PhD C.I: 0151059417

CUENCA-ECUADOR

2019



RESUMEN

El Alfaherpesvirus canino 1 (CaHV-1), antes Herpesvirus canino tipo 1 (CHV-1), es de gran importancia, ya que causa herpesvirosis canina generando mortalidad en cachorros menores a 3 semanas e incide en el desarrollo de problemas reproductivos y respiratorios en perros adultos.

En la presente investigación se buscó generar información científica confiable sobre la presencia de CaHV-1 en los perros de la ciudad de Cuenca, basada en la búsqueda de la detección del virus mediante biología molecular con una prueba de PCR convencional validada por un control de proceso en el laboratorio de biología molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. Para ello se recolectaron 202 muestras de 101 pacientes de diferente edad, raza y sexo en clínicas veterinarias, refugios, criaderos y de hogares de la ciudad de Cuenca. Las muestras fueron hisopados nasales y genitales de perros que presenten, o hayan presentado, signos sugerentes de la enfermedad y, en caso de muerte, se realizaron necropsias para tomar muestras de ganglios del nervio trigémino y riñón.

Como resultado se tuvo que, de 202 muestras colectadas se obtuvo material genético viable de ser amplificado en 181 de ellas (89,60%). De las muestras válidas se logró identificar el amplicón correspondiente al CaHV-1 en 9 (4,97%) procedentes de distintos animales, dando una frecuencia del 8,91% teniendo 6 en muestras de hisopados (3,31%) y 3 en tejidos (1,66%). Con la presente investigación como base se sugiere profundizar en el estudio del virus como su epidemiología, genotipificación entre otros aspectos.

Palabras clave: CaHV-1, PCR, PERROS, CUENCA.



ABSTRACT

Canid Alphaherpesvirus 1 (CaVH-1), before called Canine herpesvirus type 1 (CHV-1), is of great importance, since it is the cause of diseases in dogs, generating mortality in puppies under three weeks and it affects the development of the reproductive and respiratory system in adult dogs as well as latency states.

In the present investigation, the aim was to generate reliable information on the presence of CaHV-1 in dogs from the city of Cuenca, for the first time, based on the search (or research) for virus detection by molecular biology with a conventional PCR assay validated by a process control in the molecular biology laboratory of the Faculty of Agricultural Science of the University of Cuenca. For this, 202 samples of 101 patients of different age, race, and sex have been collected, on veterinary clinics as well as, shelters and canine breeding places in the city of Cuenca. The samples were of nasal and genital swabs of dogs showing signs suggestive of the disease and in some cases of death, necropsies were performed to samples trigeminal nerve ganglia and kidney.

The results showed 181 valid samples (89,60%) of the 202 samples for the process control, and of these 9 (4,97%) positive to the virus, having 3,31% in samples of swabs and 1,66% in tissue. With the present investigation as a base, it is suggested to deepen the study of the virus as its epidemiology, genotyping among other topics.

Keywords: CaHV-1, PCR, DOGS, CUENCA.



INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	18
1.1 Objetivos	19
1.1.1 Objetivo General.....	19
1.1.2 Objetivos Específicos	19
1.2 Hipótesis o pregunta de investigación.....	19
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	20
2.1 Agente etiológico: Clasificación y propiedades	20
2.2 Historia	21
2.3 Descripción de la enfermedad causada	22
2.4 Epidemiología.....	26
2.5 Transmisión.....	28
2.6 Patogenia	28
2.7 Lesiones	30
2.8 Diagnóstico.....	30
2.8.1 Hallazgos clínicos:.....	31
2.8.2 Serología:.....	31
2.8.3 Necropsia e histopatología:	31
2.8.4 Aislamiento viral:	33
2.8.5 Detección viral:.....	33
2.9 Tratamiento	35
2.10 Profilaxis y control.....	36
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1 Materiales usados para la colecta, conservación, transporte y almacenado de las muestras de hisopados o tejidos de animales susceptibles o con signología clínica compatible con la infección por CaHV-1 (Actividad experimental 1).	37
3.1.1 Biológicos:.....	37
3.1.3 Equipos y otros materiales:.....	38



3.2	Métodos aplicados en la colecta, conservación, transporte y almacenamiento de los hisopados y muestras de tejidos de los animales, para la obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) total (Actividad experimental 1).	38
3.2.1	Colecta, conservación, transporte y almacenamiento de muestras de los hisopados genitales y nasales.	38
3.2.2	Colecta, conservación, transporte y almacenamiento de muestras de tejido <i>post-mortem</i>	39
3.3	Materiales usados para el procesamiento de las muestras biológicas colectadas, extracción y purificación del ácido desoxirribonucleico total de CaHV-1 (Actividad experimental 2).	40
3.3.1	-Biológicos (conservados a 4°C en solución de conservación):	40
3.3.2	-Reactivos y soluciones:	40
3.3.3	-Equipos y otros materiales:	40
3.4	Métodos para el procesamiento de las muestras biológicas colectadas, extracción y purificación de ADN de CaHV-1 (Actividad experimental 2).....	41
3.4.1	Métodos para el procesamiento de las muestras biológicas de los hisopados colectadas, extracción y purificación de ADN de CaHV-1.	41
3.4.2	Métodos para el procesamiento de las muestras biológicas, de los tejidos, colectadas, extracción y purificación de ADN de CaHV-1.....	42
3.5	Materiales usados para la realización de las amplificaciones y detecciones de material genético mediante electroforesis en gel agarosa de la especie canina (Control de proceso para la validación de las muestras obtenidas y del rendimiento de la prueba PCR) (Actividad experimental 3).....	42
3.5.1	-Biológicos:.....	42
3.5.2	-Reactivos y soluciones:	43
3.5.3	- Equipos y otros materiales:	43
3.6	Métodos usados para la realización de las amplificaciones y detecciones de material genético mediante electroforesis en gel agarosa de la especie canina (Control de proceso para la validación de las muestras obtenidas y del rendimiento de la prueba PCR) (Actividad Experimental 3).	44
3.7	Materiales usados para la amplificación de los productos de PCR específicos para el CaHV-1 y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE y teñido con Bromuro de etidio (Actividad experimental 4).....	47
3.7.1	- Biológicos:	47



3.7.2	- Reactivos y soluciones:	47
3.7.3	-Equipos y otros materiales:	48
3.8	Métodos aplicados en la realización del proceso de amplificación de los productos de PCR específicos para el CaHV-1 y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE y teñido con Bromuro de etidio (Actividad experimental 4).	49
4.	RESULTADOS	52
4.1	Resultados de la colecta de muestras	52
4.2	Detección de material genético canino en las muestras colectadas.....	53
4.3	Detección de material genético de CaHV-1 en las muestras validadas.....	54
4.4	Distribución de las muestras positivas según edad, sexo y raza.....	55
5.	DISCUSIÓN.....	57
6.	CONCLUSIONES.....	60
7.	PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES.....	61
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	62
9.	ANEXOS.....	69



INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vista de unas partículas del virus CaHV-1 en una delgada sección de un cultivo DKC (células de riñón canino) a través de microscopía electrónica. Fuente (4) 20

Figura 2: Órganos de cachorros muertos con infección de CaHV-1. (A) Pulmones con edema y una apariencia heterogénea. La superficie esta con zonas hemorrágicas equimóticas y petequiales, (B) Riñones con hemorragias equimóticas y petequiales, (C) Hígado agrandado y sangrado petequial y (D) Timo con sangrado petequial. Fuente (13) 24

Figura 3: Cuadro explicativo de la patogenia del virus CaHV-1. Fuente (13). 29

Figura 4: Riñón con petequias en la superficies en el lado izquierdo y un riñón normal en el lado derecho. Fuente (6). 32

Figura 5: Inclusiones intranucleares en un corte histológico de un riñón canino con CaHV-1. Fuente (6). 32

Figura 6: Lesiones de CaHV-1 en un cachorro muerto de 11 días de edad. Notar las prominentes lesiones necróticas en pulmones e hígado. Lesiones típicas en riñón no son vistas. Fuente (24) 33

Figura 7: Detección de los amplicones de ADN canino (808 bp) en los carriles 1-24. Carril 19; negativo. Carril 25; control negativo. Carriles extremos derechos; Marcadores de Peso molecular de 100 bp..... 54

Figura 8: Detección de los amplicones de ADN (485 bp) de CaHV-1 en los carriles 9 y 18. Carril 25; control negativo. Carriles extremos derechos; Marcadores de Peso molecular de 100 bp..... 55



INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Seroprevalencia de CaHV-1 a nivel mundial. Fuente: (5) 27

Tabla 2: Preparación de la premezcla para la generación de productos de PCR
específicos para el control de proceso..... 45

Tabla 3: Perfil de temperatura empleado para la generación de productos de PCR
específicos del control de proceso..... 46

Tabla 4: Preparación de la premezcla para la generación de productos de PCR
específicos para la detección de CaHV-1. 49

Tabla 5: Perfil de temperatura empleado para la generación de productos de PCR
específicos para la detección de CaHV-1. 50

Tabla 6: Descripción del origen de las muestras *ante-mortem*..... 52

Tabla 7: Descripción del origen de las muestras *post-mortem*..... 52

Tabla 8: Descripción del tipo de muestras *ante-mortem*. 52

Tabla 9: Descripción del tipo de muestras *post-mortem*..... 53

Tabla 10: Distribución de las muestras positivas según sexo, edad o raza. 56



INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Formato para la colecta de datos de los animales muestreados. 69

Anexo 2: Formato de ensayo de PCR para la amplificación de material genético del control de proceso. 71

Anexo 3: Formato de ensayo de PCR para la amplificación de material genético del virus CaHV-1. 72

Anexo 4: Fórmula aplicada para la estimación de las probabilidades 73



CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL
REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Andrés Alberto Reyes Zumba, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la aplicación de un ensayo de PCR para la detección de material genético de Herpesvirus canino tipo 1 en muestras clínicas de caninos", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 04 de febrero del 2019

Andrés Alberto Reyes Zumba

C.I: 0302861240



**CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL
REPOSITORIO INSTITUCIONAL**

Yo, Joaquín Alberto Macancela Oña, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la aplicación de un ensayo de PCR para la detección de material genético de Herpesvirus canino tipo 1 en muestras clínicas de caninos", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 04 de febrero del 2019

Joaquín Alberto Macancela Oña

C.I: 0105802359



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Yo, Andrés Alberto Reyes Zumba, autor del trabajo de titulación "Evaluación de la aplicación de un ensayo de PCR para la detección de material genético de Herpesvirus canino tipo 1 en muestras clínicas de caninos", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 04 de febrero del 2019

Andrés Alberto Reyes Zumba

C.I: 0302861240



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Yo, Joaquín Alberto Macancela Oña, autor del trabajo de titulación "Evaluación de la aplicación de un ensayo de PCR para la detección de material genético de Herpesvirus canino tipo 1 en muestras clínicas de caninos", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 04 de febrero del 2019

Joaquín Alberto Macancela Oña

C.I: 0105802359



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a nuestro tutor de tesis, Dr. Estuardo Palacios, por ser parte de esta investigación y acompañarnos a lo largo de la misma.

Al Dr. Antonio Vallecillo, por ser guía, soporte, y también amigo, en nuestra investigación haciendo siempre ameno el ambiente para desarrollarnos.

Al Laboratorio de Biología Molecular por recibirnos y colaborar con el desarrollo de nuestra investigación.

A las diferentes clínicas veterinarias, refugios de animales y dueños de mascotas que colaboraron y trabajaron en conjunto con nosotros haciendo más fácil nuestra investigación.

Finalmente, a mis padres por ser mis guías a lo largo de la vida y por siempre apoyarme en todo momento permitiéndome así culminar esta etapa de mi vida.

Andrés Reyes



AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento a todos los que colaboraron en la elaboración de este estudio.

A la Universidad de Cuenca, docentes, clínicas veterinarias, criaderos, y refugios.

En especial a nuestro Tutor el Dr. Estuardo Palacios, por su ayuda y constante apoyo en el transcurso del proyecto.

Al Dr. Antonio Vallecillo, quién con su guía y experiencia en el campo de la Biología Molecular, fue de gran aporte a la investigación.

A mi amigo y compañero de tesis Andrés Reyes, por su colaboración y trabajo conjunto.

A mi familia por su paciencia y constante apoyo a lo largo del proyecto y de la carrera

Joaquin Macancela



DEDICATORIA

Este trabajo de investigación es dedicado a mis padres, Alberto y Patricia, por siempre apoyarme incondicionalmente y ser pacientes con la realización de este trabajo y, también, durante toda la carrera.

A mis hermanos, Xavier y Carlos, por darme el sentido de la responsabilidad para ser un ejemplo y por su cariño incondicional de hermanos.

A ellos en general por ser fuente de inspiración para fijarme metas que me permitan superarme.

Andrés Reyes



DEDICATORIA

Este trabajo de investigación está dedicado a todos mis amigos, compañeros y profesores, que han sido una parte importante en esta etapa de mi vida, a mi familia que siempre me han apoyado y en especial a mi madre Fátima, por enseñarme a ser una persona de bien, a superarme día a día, por ser un pilar importante en mi vida, por eso y más le dedico este trabajo.

Joaquin Macancela



1. INTRODUCCIÓN

El Alfaherpesvirus canino 1 es el agente causal de una enfermedad denominada Herpesvirosis Canina que se caracteriza por inducir una alta mortalidad en los perros durante la etapa neonatal. Además el virus puede inducir infecciones del tracto respiratorio superior o del tracto reproductivo en la etapa adulta (1), en algunos casos el virus puede asociarse con otros microorganismos y complicar el cuadro clínico, derivando así en pérdidas económicas en criaderos, por la muerte neonatal y abortos, y sentimentales en familias por afecciones en la calidad de vida de las mascotas.

En Ecuador no existen datos sobre la identificación del CaHV-1, siendo totalmente nula la información de la prevalencia e incidencia de este virus debido, principalmente, a la falta de pruebas diagnósticas válidas, por lo que los clínicos veterinarios no cuentan con antecedentes en las cuales apoyarse en el momento de tratar a un paciente sospechoso para sugerir realizar pruebas de diagnóstico adecuadas y, posteriormente, el desarrollo de un protocolo de prevención para el control de la diseminación del virus, tales como: protocolos de desinfección y controles rutinarios.

Actualmente a nivel mundial existen herramientas diagnósticas indirectas, como ELISA (del Inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), y directas, como el aislamiento viral y PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction), que son altamente confiables, siendo la biología molecular, con la técnica de PCR, la que más ventajas posee por su reducido tiempo para obtener resultados, su bajo costo y su confiabilidad por la alta sensibilidad y especificidad diagnóstica, teniendo como principio la amplificación y posterior detección de material genético permitiendo determinar la presencia del virus.

Es por esto que en esta investigación se evaluó la aplicación de un ensayo PCR como prueba diagnóstica, de biología molecular, para la identificación del CaHV-1 obteniendo así información confiable del estado sanitario del virus en las cuales puedan basarse los médicos veterinarios dedicados a la clínica para poder tomar decisiones correctas a la hora del diagnóstico y prevención de la diseminación del virus.



1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo General

Evaluar la aplicación de un ensayo de PCR para la identificación de material genético del Herpesvirus canino tipo 1 en muestras de perros con signología clínica compatible con la infección por este virus.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la aplicación de un ensayo de PCR para la detección *ante mortem* del CHV-1, en muestras de hisopados nasales y genitales de cachorros y perros adultos con signos clínicos de problemas respiratorios o reproductivos, sugestivos a herpesvirosis.
- Evaluar la aplicación de un ensayo de PCR para la identificación *post mortem* canina del CHV-1 en muestras de tejido de nódulos linfáticos retrofaríngeos y de ganglios nerviosos trigémino de perros de diferentes edades muertos por causas diversas.

1.2 Hipótesis o pregunta de investigación

Con la técnica de PCR es posible la identificación de la presencia de material genético del CHV-1 en las muestras biológicas obtenidas de perros con signología sugestiva de la infección.

2. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1 Agente etiológico: Clasificación y propiedades

El Alfa herpesvirus canino 1, CaHV-1, antes llamado Herpesvirus canino tipo 1 y de abreviatura CHV-1, pertenece a la familia *Herpesviridae*, Subfamilia *Alphaherpesvirinae*, Género *Varicellovirus* (2).

Posee ADN bicatenario, lineal y cápside de simetría icosaédrica que se constituye por 162 capsómeros (150 son hexámeros, 11 pentámeros y uno es un portal cilíndrico de acceso y salida del ADN) y la cápside se encuentra rodeada por el tegumento y por fuera del mismo encontramos a la envoltura con espículas que se encargan de inducir la respuesta inmune en el huésped (Figura 1). El tamaño del virus puede estar en un rango de 150 a 200 nm debido a la pleomorficidad de la envoltura y teniendo 128 kilobases de longitud su genoma siendo un 32% G+C (2,3).

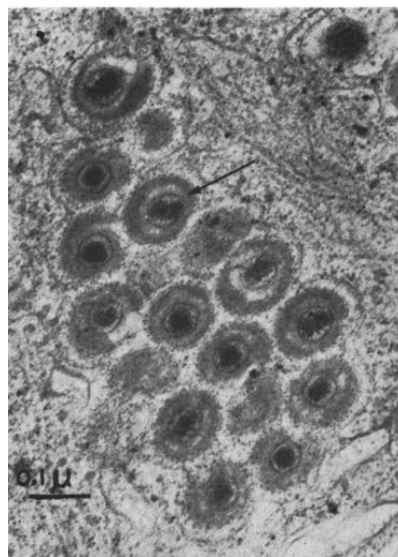


Figura 1: Vista de unas partículas del virus CaHV-1 en una delgada sección de un cultivo DKC (células de riñón canino) a través de microscopía electrónica. Fuente (4)

En la actualidad se conoce que solo hay un serotipo de este virus y se encuentra muy ligada antigénicamente con el Herpesvirus Felino (FHV) (1). Los *Alphaherpesvirus* tienen varios mamíferos como huéspedes entre ellos al perro, al gato, aves, cerdos y bovinos, siendo los perros el único huésped de CaHV-1 (5).



El CaHV-1 al igual que los demás virus Herpes tienen la habilidad de entrar en estados de latencia, en células nerviosas, ganglios (trigémico) (5,6), para volver crónica la infección y poder reactivarse después de algún tiempo dependiendo mucho de estados de inmunosupresión del animal infectado en casos como stress alimenticio, ciclo estral, enfermedades primarias entre otras. Además, también se caracterizan por poseer enzimas específicas para la síntesis y metabolismo de ADN, por la síntesis de ADN y cápsides en el núcleo y ser capaces de lisar las células del huésped infectado (3,7,8).

El CaHV-1 se replica a temperaturas menores a 37°C, siendo alrededor de 33°C lo óptimo, similar a la temperatura de la mucosa genital y del aparato respiratorio superior. A una temperatura de 4°C más del 90% se pueden inactivar y a una temperatura de 56°C por 4 minutos es mayor al 99% (4,9,10,11,12,13).

El periodo de incubación reportado para el CaHV-1 varía de 3 a 8 días generalmente en infecciones no mortales, puede acortarse el periodo de 1 a 2 días si la enfermedad es mortal en el caso de los cachorros (12).

El CaHV-1 solo afecta a los perros o a sus células en cultivos in vitro, esta especificidad se la atribuye a la presencia de receptores específicos del virus, causa una enfermedad sistémica mortal en cachorros y enfermedad respiratoria, genital y ocular en animales adultos, siendo estos signos poco específicos de la enfermedad (8,10,14,15,16).

Con respecto al pH, CaHV-1 puede ser inactivado a menos de 3 y más de 8 en la escala. También se describe su alta sensibilidad a los desinfectantes comunes, por su envuelta lipídica, a los rayos ultravioletas, al éter, al cloroformo, clorhexidina, amonio cuaternario, formoles y fenoles (3,4).

2.2 Historia

La enfermedad causada por la infección por CaHV-1 fue reportada por primera vez en el año de 1964 por Carmichael en USA atribuyéndole a *Mycoplasma spp*, posteriormente el virus fue reportado como el agente causal, luego de investigaciones realizadas por el propio Carmichael, de la enfermedad sistémica mortal en cachorros y fue identificado posteriormente en varios países como Francia, Reino Unido por Prydie



Y Cornwell en 1966 por separado. La frecuencia en los países puede ser muy variable debido a diferentes factores como el manejo de criaderos y vacunas, considerándose así el virus de distribución mundial (véase Tabla 1), además de catalogarse al virus como endémico de Europa central (5,17,18). Además de Carmichael, también hubo otros dos científicos con sus grupos conectados que en el 1965 trabajaban en la identificación del agente causal de las muertes en neonatos; estos fueron Spertzel y Stewart en USA (4). Continuaron trabajos con el virus, especialmente para la identificación de anticuerpos en USA en 1969 encontrando datos de seroprevalencia del 12% (8).

En sus comienzos se lo asoció con problemas fetales y neonatales, considerándose así uno de los principales causantes de muertes neonatales en criaderos, ahora además se relacionan con afecciones oculares, respiratorias y genitales en animales adultos (1,15,19).

En los 90 se generó una vacuna a base de virus inactivado a partir de la cepa F205, teniendo así resultados viables comparado a los estudios realizados en los finales de la década de los setenta cuando se generó estudios e investigaciones experimentales para desarrollar la vacuna que fuera capaz de inmunizar a los perros contra CaHV-1.

Según un estudio en perras, realizado en Francia, la vacuna fue exitosa al evitar la muerte de los cachorros cuyas madres fueron inmunizadas con el protocolo establecido por el fabricante que consistía en dos dosis, la primera a los 10 días después de la monta y la segunda a las 6 semanas después (20).

En 1990, Takumi y sus colaboradores desarrollaron por primera vez una prueba ELISA para la detección de anticuerpos de CaHV-1 y en Holanda en 1997, investigadores desarrollaron una prueba ELISA, con sutiles diferencias, recabando datos sobre la prevalencia de anticuerpos en perros tanto de criaderos como de casas convencionales teniendo un resultado alrededor del 40% sin que el hábitat sea un factor importante (21,22).

2.3 Descripción de la enfermedad causada

Los cuadros clínicos que se pueden describir de la enfermedad, causada por el CaHV-1 como el agente causal, son la enfermedad hemorrágica mortal en cachorros



menores a 4 semanas, en adultos problemas reproductivos, tales como abortos, infertilidad y lesiones papulares en la mucosa genital, también infecciones del tracto respiratorio superior (1,3,5,16,23).

La enfermedad hemorrágica neonatal o infección sistémica neonatal, es un cuadro clínico agudo y con una mortalidad muy alta que se produce en cachorros menores de 4 semanas presentando signología clínica en donde se evidencia una temperatura anormalmente baja.

Por lo general la infección en los neonatos se da cuando pasa por el canal de parto y tan pronto tiene contacto con los fluidos de la madre. Aunque esta es la principal forma descrita, también existe la posibilidad de que la infección ocurra de forma transplacentaria produciendo reabsorción fetal, abortos o necrosis fetal dependiendo de la etapa en la que ocurrió (13,24,25).

Por lo general los cachorros que nacen son débiles y su inmadurez, tanto en el sistema inmune como en su capacidad para regular su temperatura, los hace susceptibles de la infección presentando signos como anorexia, inapetencia, dolor abdominal a la palpación, letargia, diarrea y, rara vez, signología nerviosa como ataxia u opistótonos en fases finales previo al desenlace mortal que puede alcanzar hasta al 100% que caracteriza a este virus en las primeras 3 semanas de vida aunque en ocasiones la muerte de los cachorros puede darse sin presentar ninguna signología (24,25).

La regulación de la temperatura juega un rol importante a la hora de hacer frente a la infección viral ya que en situaciones de fiebre el virus no progresa, esto se da en adultos, pero en cachorros no es posible debido a su falta de capacidad de termorregulación hipotalámica, además la temperatura rectal en los adultos es mayor que la de los cachorros lo que les da mayor resistencia.

Los cachorros usualmente mueren a las 24 o 48 horas de haber empezado la signología y a la necropsia se puede encontrar vasculitis necrotizantes y hemorragias en varios órganos como el hígado, los riñones, pulmones, bazo (Figura 2) debido a la replicación viral en el endotelio vascular (5,13).

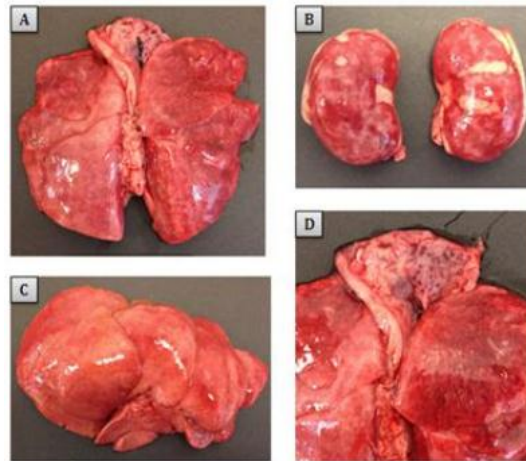


Figura 2: Órganos de cachorros muertos con infección de CaHV-1. (A) Pulmones con edema y una apariencia heterogénea. La superficie esta con zonas hemorrágicas equimóticas y petequiales, (B) Riñones con hemorragias equimóticas y petequiales, (C) Hígado agrandado y sangrado petequial y (D) Timo con sangrado petequial. Fuente (13)

En raras ocasiones un cachorro con signos neurológicos presentes logra sobrevivir, cuando esto sucede los signos más comunes como ataxia, ceguera o deficiencias vestibulares cerebelar persisten a lo largo de la vida (24).

En cachorros mayores a 3 o 4 semanas el riesgo de muerte es menor debido a al proceso de madurez que atraviesan su sistema inmune y su sistema de termorregulación pudiéndose limitar la infección a las vías respiratorias altas o a la forma ocular, pero convirtiéndolo en un reservorio del virus porque estos pueden permanecer en estados de latencia para luego volver a manifestar signos cuando haya factores de estrés o infectar a otros individuos (13).

En adultos, el CaHV-1 también se describe como causante de enfermedades del tracto respiratorio superior y ha sido reportado como implicado en el síndrome de la “tos de las perreras” o traqueobronquitis infecciosa canina, además de esto también pueden provocar enfermedades oculares en perros de diferentes edades (17,21).

Clásicamente se describe al CaHV-1 como un agente patógeno secundario en la traqueobronquitis infecciosa canino que puede estar asociado a otros patógenos virales como Adenovirus Canino tipo 2 (CAV-2), Paramixovirus tipo 2 y también con bacterias como *Bordetella Bronchiséptica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma sp.* (3).



A pesar de eso, unos estudios realizados en el 2010 a perros con traqueobronquitis infecciosa revelaron que CaHV-1 puede por sí solo ser el agente etiológico sin necesidad de estar otros agentes virales y bacterianos clásicos de la enfermedad si hay factores como la inmunodepresión (26).

La signología mostrada y su duración dependerá de los agentes involucrados teniendo en cuenta el estado inmunológico y nutricional del animal, por lo general los signos incluyen una tos seca improductiva, faringitis, rinitis, fiebre y en complicaciones severas la muerte. Estudios revelan que la presencia de CaHV-1 produce signología más severa en la traqueobronquitis infecciosa (3,24).

Otra de las manifestaciones clínicas del CaHV-1 en los adultos es la presencia de problemas reproductivos en donde se incluye lesiones a nivel de mucosa genital, abortos, infertilidad, momificación y resorciones embrionarias cuando la infección se ha producido durante la preñez (6,8).

Los problemas relacionados con la infección del virus durante la preñez pueden dividirse por la etapa en la que se produjo teniendo una etapa temprana, o el primer tercio de gestación, en donde es más factible encontrar los abortos, las momificaciones fetales, las resorciones embrionarias, los fetos anormales o nacimientos prematuros. También es factible observar en la placenta de los fetos abortados focos hemorrágicos típicamente producido por CaHV-1 (3,6).

Si la infección se produce durante etapas más avanzadas, segundo o tercer tercio de gestación, puede encontrarse camadas nacidas con el síndrome del cachorro débil (3). Las lesiones en el aparato reproductor se deben a la temperatura de las mucosas genitales tanto del macho como de la hembra ya que es la ideal para que CaHV-1 pueda replicarse ya que es menor que el resto del cuerpo. En estas mucosas se han observado signos, generalmente autolimitantes, como petequias, hiperemia, hemorragias equimóticas y lesiones vesiculares (1,3,13,24).

Las secreciones a nivel de pene o vagina se han descrito dentro de la signología, pero no de manera muy frecuente en la presencia de CaHV-1, ni siquiera en las perras que hayan sufrido abortos o nacimientos prematuros de las camadas (24,27).

En ocasiones estas lesiones vesiculares pueden ulcerarse transformando así a la lesión en una fuente de contagio viral, no muy frecuente, cuando se produzca la cópula. Aunque no es tan frecuente la observación de esta signología se ha



relacionado su aparición con el inicio del estado de proestro en las hembras y la regresión cuando están en anestro sugiriendo así que el estrés del celo en las hembras puede producir la activación de los virus que han permanecido en estado de latencia previamente (24).

Una, no muy frecuente y últimamente descrita, manifestación clínica del CaHV-1 es la forma ocular, que se presenta en los adultos como una conjuntivitis bilateral que en la mayoría de las ocasiones es débil y autolimitante, también con lesiones en párpados, úlceras en córnea, queratitis ulcerativa y no ulcerativa (5,19).

En los neonatos infectados con CaHV-1 se pueden producir importantes lesiones como panuveitis e infección viral intraocular con secuelas tales como queratitis, neuritis óptica, cataratas y, de nuevo presente, la displasia de retina (5).

2.4 Epidemiología

El CaHV-1, a pesar de no ser estable en el medio ambiente, está presente en todo el mundo. Aunque se ha reportado que el número de huéspedes del virus se limita a los caninos se ha detectado anticuerpos contra CaHV-1 en el suero de zorros rojos europeos y, también, en nutrias de río en Norteamérica, mientras que el virus ha sido aislado de cachorros de coyotes en cautiverio (3,11,15).

CaHV-1 es un virus que puede replicarse muy bien cuando existen temperaturas corporales menores a 37°C y lo encontramos con una prevalencia alta al testear serológicamente los criaderos de perros y a pesar de ello la signología clínica podría no ser observada. Sin embargo cuando se tiene altos niveles de anticuerpos de CaHV-1 en la sangre es posible relacionarlo a la presencia de problemas reproductivos, respiratorios y oculares dentro de los criaderos (24).

Aunque son limitados, pero en animales comunes son frecuentes las tasas de seropositividad de > 30%. Algunos criaderos tienen prevalencias de tasas tan altas como 100%, sin desarrollo de enfermedad en los cachorros (28). La seroprevalencia es muy variable y puede oscilar, según los países, entre un 40 y un 80% (29). Las perreras más grandes y con antecedentes de infección neonatal y además en centros de rescate, tienen mayores posibilidades de tener animales positivos a la infección, además un estudio informó títulos significativamente más altos de anticuerpos de CaHV-1 al aumentar la edad, en machos y en hembras mayores (30,31).



El uso de diferentes métodos diagnósticos y la elección de una población canina, también influyen en los resultados de las pruebas (32).

Tabla 1: Seroprevalencia de CaHV-1 a nivel mundial. Fuente: (5).

País	CaHV-1 Seroprevalencia
Argentina	23%
Bélgica	46-50%
Finlandia	82%
Francia	43%
Alemania	9-22%
Irán	21%
Italia	28%
Japón	22-26%
Países Bajos	42%
Noruega	80%
Eslovaquia	36%
South África	22%
Suiza	19%
Suecia	100%
Turquía	39-72%
Reino Unido	93-94%
Estados Unidos	6%



2.5 Transmisión

Se han descrito algunas vías de transmisión de CaHV-1, pero se consideran principales a las rutas oronasales y genitales. En los cachorros luego de la inhalación o ingestión de las partículas virales las mucosas son su primer sitio de replicación (21). Se requiere un contacto cercano para la transmisión del virus, se puede, además, transmitir a través de lameduras, tos, copulación y el parto. Los fómites es una forma rara de transmisión (15,24,33,34).

Los recién nacidos pueden adquirir la enfermedad al momento del nacimiento debido al contacto con las secreciones vaginales, al momento de pasar por el canal de parto o también en el post-parto por contacto con secreciones oronasales de la madre, o de otros animales en un criadero. Los hermanos de camadas infectadas también son una fuente de infección. Así mismo lo son las personas que manejan a estos animales infectados (6,30).

Otra vía menos común de transmisión del CaHV-1 es la, ya mencionada, vía transplacentaria, provocando diversos desordenes reproductivos en adultos, incluso la muerte de los fetos en perras gestantes (35,36).

En adultos luego de la transmisión se pueden o no observar signología. Esto es debido a la capacidad de llegar a tejidos como el nervio trigémino o los ganglios retrofaríngeos y entrar en estados de latencia características de los Alfa herpesvirus que puede ser seguida de una posible reactivación en cualquier momento que puede ser en varios meses como años, aprovechando una situación de estrés, hormonal, nutricional o fármacos inmunosupresores como los corticoesteroides (5,8,15,37,38,39).

2.6 Patogenia

Luego de la infección viral la primera replicación del virus tiene lugar a las 24 horas post infección en el epitelio y mucosa nasales y genitales, tonsilas y nasofaringe generalmente (29). Otros sitios de replicación considerados son los nódulos retrofaríngeos, nódulos linfáticos bronquiales, tejido conjuntival y, raramente, pulmones (24).

Después de la replicación, las partículas virales tienden a aprovechar la vía hematogena a los 3 o 4 días post infección para diseminarse hacia el hígado, bazo, riñón, tejido linfático, pulmones y sistema nervioso central (3).

La signología que se vaya a presentar en un animal va a depender de muchos factores como la edad, el estado inmunitario, estado nutricional, el sexo (si hay gestación o no) y la ruta de transmisión del CaHV-1 como se muestra en la figura 3 (5,13).

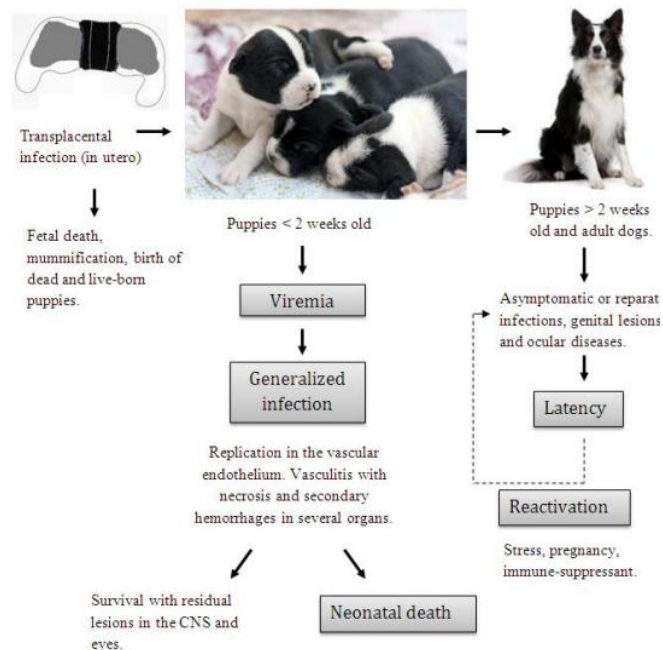


Figura 3: Cuadro explicativo de la patogenia del virus CaHV-1. Fuente (13).

En los neonatos menores de 1 semana, u otros animales inmunodeficientes, se puede desarrollar una viremia generalizada, luego hay multiplicación viral en los órganos internos y la muerte. Puede ocurrir una latencia principalmente en el ganglio trigémino que bajo condiciones de inmunosupresión puede reactivar al virus (40,41).

La mortalidad neonatal es alta debido a la capacidad que tiene el virus de replicarse rápidamente en neonatos, debido a un sistema inmunológico inmaduro y la incapacidad de mantener la temperatura lo que favorece la replicación viral, ya que una temperatura menor favorece su desarrollo (42,43).

Los animales presentan anorexia, dolor abdominal, letargia, diarrea verde-amarillenta, disnea, emesis, ptialismo, descargas nasales serohemorrágicas y llanto. Pueden observarse opistótonos y movimientos de pedaleo y otros signos nerviosos como ataxia, anacusia, ceguera y queratitis. Algunos cachorros infectados que logran equilibrar su temperatura corporal pueden presentar solamente descargas nasales y eritema abdominal y se recuperan en pocos días.



Los cachorros menores de 3 semanas mueren entre 1-2 días después de la aparición de signos clínicos. La infección por CaHV-1 no tratada en neonatos puede causar una alta mortalidad de hasta un 100% (9). Los cachorros de más de 6 semanas expuestos al virus a través de secreciones nasales de la madre se recuperan siendo portadores sanos del virus (1).

Además de presentar problemas reproductivos animales de ambos sexos presentan problemas respiratorios (24,44).

En hembras se caracteriza por hiperemia vaginal e hiperplasia linfoide. La aparición ocasional de pápulas o lesiones vesiculares en la mucosa genital evolucionan en 15 a 30 días con ulceración, pudiendo regresar en el proestro siguiente presentándose hiperplasia de las glándulas de la submucosa (1).

En machos provoca pápulas en el pene. Las lesiones observadas en pene y prepucio, son generalmente autolimitantes (1), gran número de anomalías en espermatozoides, aglutinación cabeza-cabeza de espermatozoides y leucocitos en el semen (45), las lesiones aparecen 3 días después de la infección, son autolimitantes y estas desaparecen a partir de los 4 o 5 días (46).

2.7 Lesiones

Las lesiones macroscópicas de infección fatal por CaHV-1 en recién nacidos incluyen hemorragia multifocal difusa, necrosis y decoloración gris en diversos órganos parenquimatosos, especialmente el riñón, el hígado y los pulmones (15,24), muy rara vez los neonatos se recuperan con lesiones residuales en el SNC, pulmón y riñón (47). Todos los nódulos linfáticos se encuentran agrandados e hiperémicos y el bazo está inflamado. También puede haber lesiones en el SNC (encefalitis y cerebelo). Muy frecuentemente no se observa reacción inflamatoria. Los cuerpos de inclusión intranuclear basófilos, pequeños y únicos, son más comunes en las áreas de necrosis del pulmón, hígado y riñones; a veces aparecen como cuerpos levemente acidófilos, localizados dentro del espacio nuclear (47,48).

2.8 Diagnóstico

Las infecciones por CaHV-1 pueden ser detectadas tanto con métodos directos como por métodos indirectos. Entre las pruebas usadas para el diagnóstico tenemos al



aislamiento viral, al ensayo PCR, la microscopía electrónica, la histopatología, ELISA y un ensayo de anticuerpos inmunofluorescente (5).

2.8.1 Hallazgos clínicos:

El diagnóstico en función del conjunto de signos clínicos encontrados es bastante específico, pero no es suficiente para dar un diagnóstico definitivo por lo que se debe complementar con pruebas como la histopatología y detección viral (13,16,49).

También se debe tener en cuenta la historia clínica del paciente, el lugar de origen entre otros factores como una trombocitopenia marcada (24).

2.8.2 Serología:

En 1990 se desarrolló la primera prueba ELISA para detectar anticuerpos de CaHV-1 en la sangre de los perros sospechosos. Aparentemente se podría hacer la detección incluso en etapas tempranas de la infección. Anteriormente la serología se basaba en los test de virusneutralización (22).

La serología no es muy práctica en cachorros debido al curso aguda que puede desarrollar y no hay el suficiente tiempo para desarrollar anticuerpos contra el virus, por lo tanto, está más direccionado hacia el testeo de los adultos.

Los títulos de anticuerpos altos podrían ser detectados dentro de los dos primeros meses solamente luego de ocurrida la infección. En cambio cantidades bajas de los títulos de anticuerpos hasta dentro de los dos primeros años, esto es debido a la pobre capacidad inmunogénica del virus y, sobre todo, a su capacidad de entrar en latencia.

También es importante remarcar que un resultado positivo no necesariamente expresa una infección activa, sino que puede solamente indicar una exposición al virus con lo cual se debe tener en cuenta la posibilidad de que el animal positivo sea una fuente de contagio para otros perros (24).

2.8.3 Necropsia e histopatología:

La necropsia es una técnica importante que debería realizarse por protocolo cuando se tenga muerte neonatal lo más temprano posible, por ejemplo, para encontrar lesiones típicas de CaHV-1 como hemorragias y focos necróticos frecuentes en órganos como el hígado, bazo, pulmones, placenta y riñones (figura 4), que pueden ser remitidos en cortes fijados en formalina al 10% para un estudio histopatológico (6).

En la lesión renal al corte se puede encontrar hemorragias en forma de cuña desde la pelvis renal hacia afuera (24).



Figura 4: Riñón con petequias en la superficies en el lado izquierdo y un riñón normal en el lado derecho. Fuente (6).

Es muy frecuente encontrar esplenomegalia y una linfadenomegalia generalizada (27). A la observación de los cortes histológicos se puede observar hallazgos patognomónicos de gran valor diagnóstico como las inclusiones intranucleares eosinofílicas en la periferia de los focos necróticos debido a la rápida replicación que es altamente destructiva (Figura 5) (6,13).

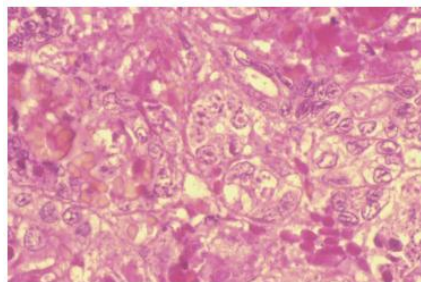


Figura 5: Inclusiones intranucleares en un corte histológico de un riñón canino con CaHV-1. Fuente (6).

Otros hallazgos observados son los edemas a nivel pulmonar con pronunciadas áreas hemorrágicas focales e hiperémicas (Figura 6). Las petequias hemorrágicas también se observan a nivel de la superficie serosa del tracto intestinal. Las displasias tanto cerebelar como de retina también son hallazgos frecuentes en perros infectados con CaHV-1 (24).

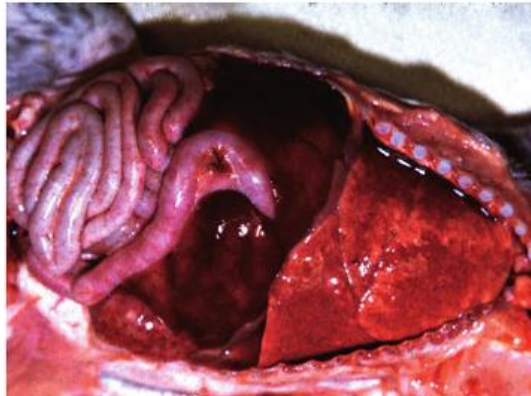


Figura 6: Lesiones de CaHV-1 en un cachorro muerto de 11 días de edad. Notar las prominentes lesiones necróticas en pulmones e hígado. Lesiones típicas en riñón no son vistas. Fuente (24)

2.8.4 Aislamiento viral:

El diagnóstico por aislamiento del virus lleva por lo general algunos días, y requiere condiciones óptimas de cultivo, hasta evidenciar el efecto citopatógeno post inoculación en células de riñón canino (19,27).

Las muestras que deben tomarse para la prueba son de glándulas adrenales, riñones, pulmones, bazo, nódulos linfáticos e hígado. Otras muestras posibles son las de hisopados nasales o genitales (24,27).

Los ensayos de PCR específicos para el CaHV-1 pueden confirmar la infección. (9). También las técnicas de anticuerpos fluorescentes y microscopía electrónica pueden detectar el virus en cultivos celulares y tisulares (24).

2.8.5 Detección viral:

Los ensayos de PCR (Polimerase Chain Reaction) hoy en día constituyen una importante herramienta diagnóstica ampliamente usada debido a las limitaciones y complicaciones que puedan tener las pruebas de serología o histología por intervenciones tardías en fetos abortados o neonatos muertos (6).

El diagnóstico por PCR mediante la detección del genoma del virus, nos permite un conocimiento rápido y preciso de la presencia o ausencia del virus, donde las otras técnicas para detectar el virus pueden no ser lo suficientemente sensibles. Esta prueba puede ser realizada *ante-mortem* o *post-mortem* (44,50)(44)(50).



Incluso es útil para testear perros asintomáticos pero que hayan estado en contactos con perros sospechosos o positivos al virus (13,24).

Las muestras procedentes de recién nacidos son de preferencia a partir de riñones, hígado, pulmones, bazo, linfonódulos y glándulas suprarrenales. En adultos, se puede lograr a partir de hisopados nasales, vaginales o prepuciales (27). También se ha reportado que se puede detectar al virus a partir de muestras conjuntivales o corneales (5,51).

Esto es debido al tropismo de CaHV-1 y por lo tanto mayores concentraciones del virus (24,52).

2.8.5.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

Los orígenes del PCR se remontan a los inicios de los 80s en una corporación de California llamada Cetus en donde la idea la tuvo el investigador Kary Mullis y desde ahí ha ido aumentando la aplicabilidad en diagnóstico de varios agentes etiológicos (53).

Uno de los factores a mejorar, luego del desarrollo de la prueba, fue la enzima, precisamente que le da el nombre a la prueba, usada. La primera polimerasa usada fue extraída de una cepa de la bacteria *Escherichia coli*. La prueba tenía limitaciones como la inactivación a temperaturas altas que obligaba a usar alícuotas en cada nuevo ciclo lo cual demoraba en tiempo y aumentaba las probabilidades de contaminación. Posteriormente apareció una nueva ADN polimerasa estable a los cambios de temperatura obtenida a partir de la bacteria *Thermophilus aquaticus* (53).

Esta prueba diagnóstica se basa principalmente en la amplificación y detección de una secuencia específica del ADN del patógeno que se busca en una muestra clínica (27).

Las muestras clínicas obtenidas de donde se pretende extraer el ADN del agente etiológico deben pasar por un procesamiento previo en donde se debe extraer el ADN para luego ser purificado y poder pasar al siguiente paso que es la amplificación.

En la amplificación del ADN, donde el objetivo es copiar millones de veces el ADN diana para su estudio, se usan varios elementos reactivos como la enzima ADN polimerasa que es la encargada de catalizar la reacción, cebadores, o *primers*, que sean específicos de una secuencia de ADN del agente etiológico, desoxirribonucleótidos fosfatados, magnesio, un buffer y agua apropiada entre otros



que serán mezclados con el ADN diana y puestos en un termociclador en donde se someten a 3 procesos (desnaturalización, alineación y extensión) durante varios ciclos repetidos que componen el PCR (54).

La desnaturalización consiste en el aumento de la temperatura hasta unos 95°C aproximadamente que separa las cadenas de ADN.

La alineación consiste en la hibridación de los *primers* a los templados (cadena de ADN) en un extremo 3' con su secuencia complementaria a una temperatura adecuada que por lo general es de 50 a 60°C.

La extensión es el paso en donde actúa la enzima *Taq* polimerasa sobre el complejo templado-primero catalizando la reacción al agregar los dNTP's necesarios para formar la nueva cadena completa de ADN a una temperatura de 72°C (54).

Finalmente se procede a leer el resultado mediante electroforesis usando típicamente gel de agarosa para visualizar el tamaño de los amplicones y determinar la presencia del genoma viral (27,55).

En resumen, la prueba diagnóstica consta de 3 pasos en donde el primero es el procesamiento de la muestra, el segundo es la amplificación del material genético obtenido a través de un termociclador y, finalmente, el tercero es la identificación del ADN amplificado a través de la electroforesis u otros métodos (55).

2.9 Tratamiento

En animales que aún no han desarrollado signología sistémica se recomienda la aplicación de 1-2 ml de suero hiperinmune de una madre infectada (De Palma), parece tener un valor limitado, pero su éxito depende de la presencia de niveles adecuados de anticuerpos séricos, se lo administra por vía intraperitoneal, cada 12 horas durante 2 días, aunque es poco eficaz (9,49).

Los cachorros menores de 3 semanas afectados suelen tener mal pronóstico por la edad y rapidez de progresión de la infección pero pueden ser tratados con cuidados de soporte y con vidabarina (3,45). Además, la elevación artificial de la temperatura corporal ayuda a reducir la replicación viral y la mortalidad (13,24,56).

Aunque en cachorros mayores de 3-4 semanas y en adultos el virus puede no ser letal e, incluso, autolimitante se puede establecer una terapia sintomática de acuerdo con la signología mostrada (13).



En las formas oculares de la infección, la terapia antiviral oftálmica es recomendada. Idoxuridina al 0,1% y soluciones oftálmicas al 1% de trifluridina se deben administrar 6 u 8 veces al día durante las primeras 48 horas y luego se reducen a 4 veces hasta la resolución (5).

Los antibióticos oculares son recomendados para evitar infecciones secundarias que puedan agravar el cuadro con lesiones como perforación corneal. También se recomienda el uso de collar isabelino para reducir las posibilidades de autolesiones debido a las molestias que puede sentir el animal (5).

2.10 Profilaxis y control

La detección temprana de los perros infectados con CaHV-1 se considera como la herramienta más importante para evitar la propagación del virus (22).

Solo se dispone de una vacuna inactivada en el continente europeo (Eurican Herpes 205) que ha estado disponible desde el 2003 (9), la cual se aplica al momento del celo y cerca de los 50 días después del apareamiento podría dar protección contra la enfermedad aguda en neonatos (3). Se ha demostrado que los cachorros de madres vacunadas tienen buena protección contra el virus y se puede evitar su muerte (13).

Además, es fundamental el uso de los desinfectantes ya que el virus ofrece poca resistencia (33). También una nutrición adecuada y el control de la temperatura del ambiente donde se encuentran los recién nacidos (Incubadora, bolsas de agua caliente, manta eléctrica, lámpara infrarroja, etc.) para mantener la normotemia, son medidas que se puede tomar, en lugares en donde haya sido identificado con anterioridad el virus (8,42).

Para evitar la reactivación del virus en adultos se debe evitar en lo posible el uso de glucocorticoides en dosis inmunosupresoras (27).

Las pruebas de PCR a cualquier animal es de gran utilidad, especialmente en los criaderos, para evitar la introducción de un animal infectado con el virus. Así mismo para las reproducciones se recomienda inseminación artificial y testear con PCR al semen antes de usarlo (6).

No se recomienda en lo absoluto la eliminación de los animales serológicamente positivos puesto que habrán otros negativos con estados de latencia que son un reservorio para posibles contagios (6).



3. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se describen los materiales y métodos que se aplicaron en las diferentes actividades en el presente proyecto de titulación para lograr los objetivos establecidos.

Las muestras fueron obtenidas de un total de 101 animales independientemente de su edad, sexo o raza, que hayan presentado la signología sugerente a la enfermedad, tomando dos muestras por animal *ante* o *post mortem* en un porcentaje de 88% y 12% respectivamente.

3.1 Materiales usados para la colecta, conservación, transporte y almacenado de las muestras de hisopados o tejidos de animales susceptibles o con signología clínica compatible con la infección por CaHV-1 (Actividad experimental 1).

3.1.1 Biológicos:

- Muestras colectadas de perros sospechosos de estar infectados con el virus:
- Hisopados nasales
- Hisopados genitales (Vaginales y prepuciales)
- Tejido de riñón
- Tejido de ganglio nervioso del trigémino.

3.1.2 Reactivos y soluciones:

- Solución de conservación: (Solución al 80% de Etanol, con 10 mM de Tris-HCl (Sigma, Cat. No.: T4661), pH 8.0, 1 mM de EDTA (Sigma, Cat. No.: EDS) y 2.5% de Glicerina), con lo cual se elaboró 1000 ml de solución utilizando 833 ml de Etanol al 80%, luego se adicionó 10 ml de Buffer TE 10:1 100X, 25 ml de Glicerina y aforamos con 132 ml de agua MQ, para ser mezclada, filtrada y para esterilizar.
- Solución TE 10:1 100X. (Con 1M de Tris-HCl pH 8.0 y 100 mM de EDTA.
- Solución a 2 M de Tris-HCl, pH 8.0.
- Solución a 500 mM de EDTA, pH 8.0.



- Todas estas soluciones fueron mantenidas a temperatura ambiente y protegidas de la luz solar.

3.1.3 Equipos y otros materiales:

- Platina de calentamiento y agitación magnética
- Potenciómetro
- pHmetro
- Micropipetas de diferentes volúmenes y sus puntas
- Autoclave
- Equipo de filtración (\varnothing 0.22 μ m)
- Probetas y recipientes para soluciones
- Recipiente para muestras (Tubos Falcon de 15 ml u otro)
- Kit de disección y formatos para la colecta de la muestra
- Guantes y solución desinfectante (Etanol 70%)
- Caja térmica para almacenar y transportar los tubos
- Marcador resistente al agua y alcohol
- Hisopos estériles

3.2 Métodos aplicados en la colecta, conservación, transporte y almacenamiento de los hisopados y muestras de tejidos de los animales, para la obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) total (Actividad experimental 1).

3.2.1 Colecta, conservación, transporte y almacenamiento de muestras de los hisopados genitales y nasales.

Paso 1: Luego de preparar la solución para la conservación, se colocaron 2 ml en tubos Falcon de 15 ml para conservar los hisopados.

Paso 2: Se esterilizaron hisopos de madera de una sola cabeza en el autoclave a una temperatura de 121°C durante 15 minutos.

Paso 3: Se hizo la colecta de las muestras, de forma aséptica, con los hisopos estériles tanto de mucosa genital como nasal de perros con signología sugerente de la



infección por CaHV-1 y se rompió el mango del hisopo para poder cerrar el tubo Falcon contenedor de la muestra.

Paso 4: Se identificó correctamente el tubo de la muestra con los datos necesarios y se llenó la hoja de campo con datos del animal y del establecimiento en donde se obtuvo la muestra.

Paso 5: Para el transporte de las muestras se usó cajas térmicas que nos evitó el derrame de los tubos, su exposición a los rayos solares y cambios drásticos de temperatura.

Paso 6: Para el almacenamiento de las muestras se evitó la exposición al sol y se mantuvo en refrigeración (4°C) hasta el procesamiento de éstas en el laboratorio de biología molecular de la facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

3.2.2 Colecta, conservación, transporte y almacenamiento de muestras de tejido *post-mortem*.

Paso 1: En tubos Falcon de 15 ml se colocaron 8 ml de solución para conservación de las muestras. Se colectaron los tejidos de ganglio nervioso del trigémino y de riñón.

Paso 2: Para la colecta se tomaron muestras del tejido no mayores a 2 mm de grosor, 1 gr de peso aproximadamente, haciendo que el volumen total del tubo no sea mayor a 10 ml.

Paso 3: Se identificaron los tubos con las muestras correctamente con los datos necesarios tanto del animal como del establecimiento.

Paso 4: Para el transporte de las muestras se usó cajas térmicas que nos evitó posibles derrames, exposición solar de los tubos y cambios bruscos de temperatura.

Paso 5: Para almacenar las muestras, se colocaron los recipientes en refrigeración a (4 °C). Con este procedimiento se pudo mantener viables las muestras hasta el procesamiento de las muestras en el laboratorio de biología molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

Paso 6: Antes del procesamiento de las muestras se eliminó la mayor cantidad posible de la solución de conservación.



3.3 Materiales usados para el procesamiento de las muestras biológicas colectadas, extracción y purificación del ácido desoxirribonucleico total de CaHV-1 (Actividad experimental 2).

3.3.1 -Biológicos (conservados a 4°C en solución de conservación):

- Hisopados de mucosas genitales y nasales
- Tejido *post-mortem* de riñones
- Tejido *post-mortem* de ganglio del nervio trigémino

3.3.2 -Reactivos y soluciones:

- Solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, SDS 0.5% (Sigma, Cat. No.: 71725))
- Solución de proteinasa K a una concentración de 2.5 mg/ml, esta se almacenará en alícuotas a -20°C, protegidas de la luz. (Sigma, Cat. No.: P2308)
- Solución 25:24:1 de Fenol, Cloroformo y Ac. Isoamílico (Sigma, Cat. No: 77619), almacenado en refrigeración y protegido de la luz
- Solución de Etanol al 100% (Sigma, Cat. No: E7023)
- Solución de Etanol al 70%

3.3.3 -Equipos y otros materiales:

- Micropipetas de diferentes volúmenes y sus puntas
- Guantes
- Tubos eppendorf de 2,0 ml
- Vórtex
- Nanocentrífuga
- Incubadora



3.4 Métodos para el procesamiento de las muestras biológicas colectadas, extracción y purificación de ADN de CaHV-1 (Actividad experimental 2).

3.4.1 Métodos para el procesamiento de las muestras biológicas de los hisopados colectadas, extracción y purificación de ADN de CaHV-1.

Paso 1: Se prepararon las soluciones y se tomó una porción de las muestras de los hisopados mantenidos en la solución de conservación a 4°C.

Paso 2: Se procedió a separar la mayor parte del material biológico de la muestra de la solución de conservación mediante la agitación en el vórtex y se retiró cuidadosamente el hisopo.

Paso 3: Se sometió a centrifugación de 12,000 x g por 10 minutos para obtener el sedimento.

Paso 4: Se tomó aproximadamente +/- 20 µl y se colocará en un tubo Eppendorf de 2.0 ml con 225 µl de solución de lisis y 25 µl de solución de proteinasa K y se dejó incubando en agitación constante a 56 °C durante toda la noche.

Paso 5: Luego del proceso de digestión, se le adicionó 250 µl de las soluciones Fenol/Cloroformo/Ac. isoamílico 25:24:1 y se mezcló en un vórtex por 20 s.

Paso 6: Se centrifugó a 12.000 x g por 10 min a 4 °C. Se colectó el sobrenadante (± 200 µl) y colocarlo en un tubo Eppendorf de 1,5 ml nuevo.

Paso 7: Se adicionó 2,5 ml de volumen de Etanol absoluto, se mezcló por inversión y centrifugó a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C

Paso 8: Después se retiró el sobrenadante, eliminando lo máximo posible con ayuda de una porción de papel absorbente. Se agregó 500 µl de Etanol al 70%, se mezcló por inversión y centrifugó a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C.

Paso 9: Se retiró el sobrenadante, se procedió a eliminar lo máximo posible con ayuda de una porción de papel absorbente. Se secó la pastilla a temperatura ambiente protegida del polvo.

Paso 11: Luego se suspendió la pastilla en 25 – 50 µl de la solución de TE 10:1 (pH 8.0). Posteriormente se almacenó la muestra de ADN total a 20 °C para luego amplificarlo en el termociclador y someterlo a electroforesis.



3.4.2 Métodos para el procesamiento de las muestras biológicas, de los tejidos, colectadas, extracción y purificación de ADN de CaHV-1.

Paso 1: Una vez que se obtuvo las soluciones preparadas se tomó una porción de las muestras de tejido colectados y se dejó sobre un papel estéril, esto para eliminar la mayor cantidad de solución de conservación.

Paso 2: Se tomó aproximadamente 200 mg de la muestra y se colocó en un tubo Eppendorf de 2.0 ml con 450 μ l de solución de lisis y 50 μ l de solución de proteinasa K, esto se incubará en agitación constante a 56 °C durante toda la noche.

Paso 3: Luego de finalizado el proceso de digestión, se le adicionó 500 μ l de las soluciones Fenol/Cloroformo/Ac. isoamílico 25:24:1 que se mezcló en un vórtex por 20-30 s.

Paso 4: Posterior a esto, se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a 4 °C, luego de finalizada la centrifugación se colectó 400 μ l del sobrenadante y se colocó en un tubo Eppendorf nuevo de 2 ml adicionándole 2.5 volúmenes de Etanol al 100%, lo cual se mezcló invirtiendo el tubo por 10-20 s.

Paso 5: Se volvió a centrifugar a 12.000 x g durante 10 minutos a 4 °C, eliminando la solución de forma cuidadosa para no perder la pastilla de ADN precipitada y se le adicionó 500 μ l de Etanol al 70%, en esto se repitió la centrifugación y se eliminó completamente la solución de Etanol al 70%.

Paso 6: La pastilla obtenida se secó a temperatura ambiente, protegida de la luz y el polvo, esta pastilla de ADN se resuspendió en 50 μ l de solución tamponada TE 10:1, de esto se tomó una alícuota para amplificarlo en el termociclador y luego someter a electroforesis en gel de agarosa-TAE con el colorante de Bromuro de etidio.

3.5 Materiales usados para la realización de las amplificaciones y detecciones de material genético mediante electroforesis en gel agarosa de la especie canina (Control de proceso para la validación de las muestras obtenidas y del rendimiento de la prueba PCR) (Actividad experimental 3).

3.5.1 -Biológicos:

- Muestras de ácidos nucleicos obtenidos



3.5.2 -Reactivos y soluciones:

- Se manejó las soluciones y mezclas preferentemente a una temperatura de 4 °C manteniendo los recipientes abiertos el menor tiempo posible. Para esto se emplearon:
- Alícuotas de agua grado biología molecular (Sigma, Cat. No.: W4502)
- Enzima *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, Cat. No.: 10966-033) con la Solución buffer de amplificación 10X y la Solución a 50 mM de MgCl₂. Se prepararon alícuotas de las soluciones y se almacenaron a -20 °C, protegidas de la luz directa.
- Solución de dNTP's a una concentración de 5 mg/ml (Trifosfato de Desoxinucleotidos) (dNTP's set, Thermo scientific, Cat. No.: R0182). Se prepararon alícuotas y se almacenaron -20 °C y protegidas de la luz directa.
- Set de oligonucleótidos específicos para el control de proceso (especie canina): DOGCyB-For: 5'-GGAGTATGCTTGATTCTACAG-3'; DOGCyB-Rev: 5'-AGAAGTGGAATGAATGCC-3'.
- Soluciones de ADN total obtenidos a partir de hisopos genitales y nasales y tejidos post-mortem de perros sospechosos de estar infectados con CaHV-1
- Agarosa (Invitrogen, Cat. No: 16500-100)
- Solución tamponada TAE 1X (Solución a 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0 y 1 mM de EDTA); también se preparó una solución utilizando 10 mg/ml de Bromuro de etidio (Sigma, Cat. No: E7637).
- Una solución tamponada de carga para ADN 6X (Solución a 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 60 mM de EDTA. 0.03 % de Azul de Bromofenol (Sigma, Cat. No: B8026); 0.03 % de Xilencianol (Sigma, Cat. No: X4126) y 60 % de Glicerol, en cantidad suficiente para 100 ml.
- Marcador de peso molecular para ADN (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo scientific Cat. No.: SM0321). Estas soluciones se almacenaron en forma adecuada, de acuerdo con cada tipo de solución, con una temperatura adecuada, protegidas de la luz y el polvo.

3.5.3 - Equipos y otros materiales:

- Micropipetas de diferentes volúmenes y sus puntas



- Vórtex
- Nanocentrífuga
- Cabina de PCR
- Termociclador
- Congelador a -20 °C, sin descongelamiento automático
- Fuente de poder
- Cámara de electroforesis horizontal
- Balanza
- Horno de microondas
- Transiluminador UV
- Fotodocumentador UV-Impresora
- Potenciómetro
- Platina de agitación y calentamiento

3.6 Métodos usados para la realización de las amplificaciones y detecciones de material genético mediante electroforesis en gel agarosa de la especie canina (Control de proceso para la validación de las muestras obtenidas y del rendimiento de la prueba PCR) (Actividad Experimental 3).

Paso 1: Para el proceso se debió descongelar en hielo los reactivos necesarios para la amplificación.

Paso 2: Una vez descongelados todos los reactivos necesarios, preparar la premezcla en el volumen requerido para el número de muestras a analizar, colocando los reactivos siguiendo un orden como lo muestra la Tabla 2.



Tabla 2: Preparación de la premezcla para la generación de productos de PCR específicos para el control de proceso.

Reactivo	Concentración		Volumen	
	Inicial	Final	Por reacción	De premezcla 10 muestras
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	-----	90.75 μ l
Tampón de amplificación 10X	10X	1X	-----	12.5 μ l
Solución de MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	-----	5 μ l
Solución de dNTP's	10 mM c/u	0.2 mM c/u	-----	1.25 μ l
Oligonucleótidos DOG CyB-F	100 μ M	0.8 μ M	-----	1 μ l
Oligonucleótidos DOG CyB-R (100 μ M)	100 μ M	0.8 μ M	-----	1 μ l
Enzima <i>Taq</i> ADN polimerasa	5 U/ μ l	0.05 U/ μ l	-----	1 μ l
Muestra de ADN total	25 ng/ μ l	5 ng/ μ l	-----	12.5 μ l
Volumen final	---	---	-----	125 μ l

Paso 3: A la premezcla se le sometió en vórtex por 2-3 s, luego se colectó todo el volumen con una breve centrifugación por 10 s.

Paso 4: Los tubos de PCR requeridos se identificaron de manera adecuada, en cada tubo se colocó la cantidad que corresponde de la solución de ADN total de las muestras a analizar con la ayuda de una micropipeta.

Paso 5: Luego se dispensó el volumen dado de la premezcla (9 μ l) en cada uno de los tubos de PCR en los que se colocó la solución de ADN (2 μ l).

Paso 6: Se mezcló en vórtex el contenido de los tubos de PCR y se colectó el volumen total por nanocentrifugación, a continuación, se utilizó el termociclador previamente



programado con el siguiente perfil de temperatura (Tabla 3) para obtener los amplicones del control de proceso

Tabla 3: Perfil de temperatura empleado para la generación de productos de PCR específicos del control de proceso.

Paso:	Desnaturalización inicial	Número de ciclos: 35			Extensión Final	Almacenamiento
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión		
Tiempo (min´, seg´)	5´0”	0´50”	0´25”	0´45”	5´0”	8
Temperatura	94°C	94°C	55°C	72°C	72°C	4°C

Paso 7: Una vez concluido el proceso de amplificación se retiraron los tubos del termociclador, pudiendo conservarlos a -20 °C por varias semanas, para ser analizados inmediatamente mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE, para lo cual se preparó el gel al 1,2% de agarosa, con 3 µl de Bromuro de etidio, en solución electrolítica tamponada TAE al 1X, disolviendo completamente para obtener el porcentaje señalado en la solución TAE.

Paso 8: En la cámara horizontal de electroforesis previamente armada se vertió el gel, se esperó hasta que se gelifique y se colocó el volumen suficiente de la solución TAE y posterior a esto se retiró el peine para formación de pocillos en el gel y demás aditamentos de la cámara.

Paso 9: Se colocó en cada uno de los pocillos 9 µl de la muestra previamente mezclada con 2 µl de la solución tamponada de carga 6X. En el pocillo 1 se colocó 5 µl de la solución del marcador de peso molecular.



Paso 10: Una vez concluida la carga del marcador de peso molecular y las muestras se ensamblaron el circuito eléctrico de la cámara de electroforesis con la fuente de poder y se inició el proceso con 100 voltios durante 1 hora.

Paso 11: Una vez que se haya conseguido el resultado deseado en la resolución de los productos de PCR en la electroforesis, se procedió a documentar la imagen en gel en el fotodocumentador y se imprimió la fotografía para generar un respaldo físico del resultado. Se clasificaron los resultados como muestras válidas y no válidas de acuerdo a su tamaño siendo 808 bp necesarios para ser catalogados como positivos.

3.7 Materiales usados para la amplificación de los productos de PCR específicos para el CaHV-1 y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE y teñido con Bromuro de etidio (Actividad experimental 4).

3.7.1 - Biológicos:

- ADN total purificado para cada una de las muestras que fueron válidas.

3.7.2 - Reactivos y soluciones:

- Alícuotas de agua grado biología molecular (Sigma, Cat. No.: W4502)
- Enzima *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, Cat. No.: 10966-033) con la Solución buffer de amplificación 10X y la Solución a 50 mM de MgCl₂. Se prepararon alícuotas de las soluciones y se almacenaron a -20 °C, protegidas de la luz directa.
- Solución de dNTP's a una concentración de 5 mg/ml (Trifosfato de Desoxinucleotidos) (dNTP's set, Thermoscientific, Cat. No.: R0182). Se prepararon alícuotas y se almacenaron -20 °C y protegidas de la luz directa.
- Set de oligonucleótidos específicos para CaHV-1. (IE-1 primer; 5'-GATAATTCAGCTTCTAGCGATG-3', IE-2 primer; 5'-GATCTCACATC TATAGTTTGGAG-3').
- Soluciones de ADN total purificados de las muestras validadas que fueron obtenidos a partir de hisopos genitales y nasales y tejidos *post-mortem* de perros sospechosos de estar infectados con CaHV-1
- Agarosa (Invitrogen, Cat. No: 16500-100)



- Solución tamponada TAE 1X (Solución a 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0 y 1 mM de EDTA); también se preparó una solución utilizando 10 mg/ml de Bromuro de etidio (Sigma, Cat. No: E7637).
- Una solución tamponada de carga para ADN 6X (Solución a 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 60 mM de EDTA. 0.03 % de Azul de Bromofenol (Sigma, Cat. No: B8026); 0.03 % de Xilencianol (Sigma, Cat. No: X4126) y 60 % de Glicerol, en cantidad suficiente para 100 ml.
- Marcador de peso molecular para ADN (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo scientific Cat. No.: SM0321). Estas soluciones se almacenaron en forma adecuada, de acuerdo con cada tipo de solución, con una temperatura adecuada, protegidas de la luz y el polvo.

3.7.3 -Equipos y otros materiales:

- Micropipetas de diferentes volúmenes.
- Vórtex
- Nanocentrífuga
- Cabina de PCR
- Termociclador
- Congelador a -20 °C, sin descongelamiento automático
- Fuente de poder
- Cámara de electroforesis horizontal
- Balanza analítica
- Horno de microondas
- Transiluminador UV
- Fotodocumentador UV
- Impresora
- Potenciómetro
- pHmetro
- Platina de agitación y calentamiento



3.8 Métodos aplicados en la realización del proceso de amplificación de los productos de PCR específicos para el CaHV-1 y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE y teñido con Bromuro de etidio (Actividad experimental 4).

Paso 1: Para el proceso se descongeló en hielo los reactivos necesarios para la amplificación.

Paso 2: Una vez descongelados todos los reactivos necesarios, preparar la premezcla en el volumen requerido para el número de muestras a analizar, colocando los reactivos siguiendo un orden como lo muestra la Tabla 4.

Tabla 4: Preparación de la premezcla para la generación de productos de PCR específicos para la detección de CaHV-1.

Reactivo	Concentración		Volumen	
	Inicial	Final	Por reacción	De premezcla 10 muestras
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	-----	90.75 µl
Tampón de amplificación 10X	10X	1X	-----	12.5 µl
Solución de MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	-----	5 µl
Solución de dNTP's	10 mM c/u	0.2 mM c/u	-----	1.25 µl
Oligonucleótidos IE-1	100 µM	0,8 µM	-----	1 µl
Oligonucleótidos IE-2 (100 µM)	100 µM	0,8 µM	-----	1 µl
Enzima <i>Taq</i> ADN polimerasa	5 U/µl	0.05 U/µl	-----	1 µl
Muestra de ADN total	25 ng/ µl	5 ng/ µl	-----	12.5 µl
Volumen final	---	---	-----	125 µl



Paso 3: A la premezcla se le sometió en vórtex por 2-3 s, luego se colectó todo el volumen con una breve centrifugación por 10 s.

Paso 4: Los tubos de PCR requeridos se identificaron de manera adecuada, en cada tubo se colocó la cantidad que corresponde de la solución de ADN total de las muestras a analizar con la ayuda de una micropipeta.

Paso 5: Luego se dispensó el volumen dado de la premezcla (9 µl) en cada uno de los tubos de PCR en los que se colocó la solución de ADN (2 µl).

Paso 6: Se mezcló en vórtex el contenido de los tubos de PCR y se colectó el volumen total por nanocentrifugación, a continuación, se utilizó el termociclador previamente programado con el siguiente perfil de temperatura (Tabla 5) para obtener los amplicones del ensayo de detección del virus.

Tabla 5: Perfil de temperatura empleado para la generación de productos de PCR específicos para la detección de CaHV-1.

Paso:	Desnaturalización inicial	Número de ciclos: 40			Extensión Final	Almacenamiento
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión		
Tiempo (min´, seg´)	5' 0''	0' 35''	0' 25''	0' 30''	5' 0''	∞
Temperatura	94.0°C	94.0°C	50.0°C	72.0°C	72.0°C	4.0°C

Paso 7: Una vez concluido el proceso de amplificación se retiraron los tubos del termociclador, pudiendo conservarlos a -20 °C por varias semanas, para ser analizados inmediatamente mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE, para lo cual se preparó el gel al 1,2% de agarosa, con 3 µl de Bromuro de etidio, en solución electrolítica tamponada TAE al 1X, disolviendo completamente para obtener el porcentaje señalado en la solución TAE.



Paso 8: En la cámara horizontal de electroforesis previamente armada se vertió el gel, se esperó hasta que se gelifique y se colocó el volumen suficiente de la solución TAE y posterior a esto se retiró el peine para formación de pocillos en el gel y demás aditamentos de la cámara.

Paso 9: Se colocó en cada uno de los pocillos 9 μ l de la muestra previamente mezclada con 2 μ l de la solución tamponada de carga 6X. En el pocillo 1 se colocó 5 μ l de la solución del marcador de peso molecular.

Paso 10: Una vez concluida la carga del marcador de peso molecular y las muestras se ensamblaron el circuito eléctrico de la cámara de electroforesis con la fuente de poder y se inició el proceso con 100 Voltios durante 1 hora.

Paso 11: Una vez que se haya conseguido el resultado deseado en la resolución de los productos de PCR en la electroforesis, se procedió a documentar la imagen en gel en el fotodocumentador y se imprimió la fotografía para generar un respaldo físico del resultado. Se clasificaron los resultados como positivas de acuerdo con el tamaño esperado de 485 bp.



4. RESULTADOS

4.1 Resultados de la colecta de muestras

Para esta investigación se recolectaron 202 muestras procedentes de 101 perros, siendo estos hisopados nasales ($n= 89$), hisopados genitales ($n= 89$) y muestras de tejido canino ($n= 24$) de distintas clínicas veterinarias, criaderos y un refugio. Las descripciones de las muestras están en las tablas 6, 7, 8 y 9.

Tabla 6: Descripción del origen de las muestras *ante-mortem*.

Lugar de procedencia	Muestras <i>Ante-mortem</i>				Positivos	Porcentaje
	Número de Muestras	Porcentaje	Validadas	Porcentaje Válidas		
Clínicas	58	32.58	52	89.66	0	0
Criaderos	28	15.73	27	96.43	3	11.11
Refugios	10	5.62	8	80	0	0
Otros	82	46.07	70	85.37	3	4.29
Total	178	100	157	88.20	6	3.82

Tabla 7: Descripción del origen de las muestras *post-mortem*.

Lugar de procedencia	Muestras <i>Post-mortem</i>				Positivos	Porcentaje
	Número de Muestras	Porcentaje	Validadas	Porcentaje Válidas		
Clínicas	20	81.82	20	100	3	15
Otros	4	18.18	4	100	0	0
Total	24	100	24	100	3	12.50

Tabla 8: Descripción del tipo de muestras *ante-mortem*.

Hisopados	Número de Muestras	Tipo de muestra <i>ante-mortem</i>				Positivos	Porcentaje
		Porcentaje	Validadas	Porcentaje Válidas			
Nasal	89	50	79	88.76	1	1.27	
Genital	89	50	78	87.64	5	6.41	
Total	178	100	157	88.20	6	3.82	

**Tabla 9:** Descripción del tipo de muestras *post-mortem*.

Tejido	Número de Muestras	Tipos de muestras <i>post-mortem</i>				Positivos	Porcentaje
		Porcentaje	Validadas	Porcentaje Validadas			
Riñón	12	50	12	100	3	25	
Ganglio	12	50	12	100	0	0	
Total	24	100	24	100	3	12.50	

4.2 Detección de material genético canino en las muestras colectadas.

Después de la aplicación de los protocolos establecidos para el procesamiento y la purificación de ADN total de las muestras se logró obtener ADN total en 181 muestras de las 202 colectadas el ensayo de PCR correspondiente al control de proceso (Tablas 6 y 7).

El tamaño esperado de la cadena de ADN era de 808 bp para ser catalogada como validada, a la detección de material genético canino, al usar los primers DOG CyB-F y DOG CyB-R.

De las 21 muestras que no se logró obtener el tamaño de ADN esperado, y por lo tanto fueron invalidadas, 9 corresponden a muestras de hisopados nasales y 12 a hisopados genitales.

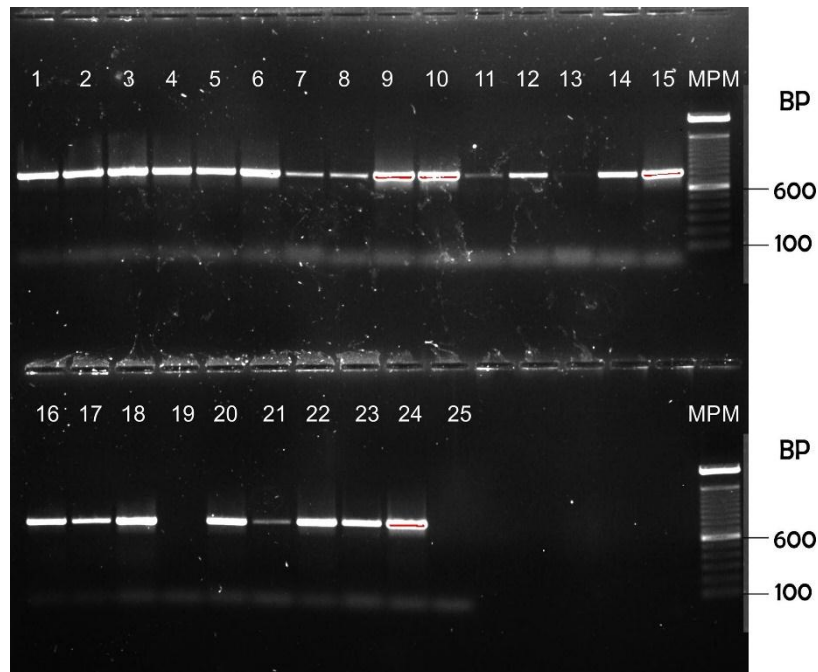


Figura 7: Detección de los amplicones de ADN canino (808 bp) en los carriles 1-24. Carril 19; negativo. Carril 25; control negativo. Carriles extremos derechos; Marcadores de Peso molecular de 100 bp.

4.3 Detección de material genético de CaHV-1 en las muestras validadas.

El total de muestras validadas ($n= 181$) se sometieron al ensayo de PCR diagnóstico usando los sets de primers IE-1 y IE-2 para CaHV-1. Los resultados muestran un total de 9 muestras positivas, de distintos individuos, al obtenerse una cadena de ADN de 485 bp compatibles con los esperados al usar los primers mencionados previamente.

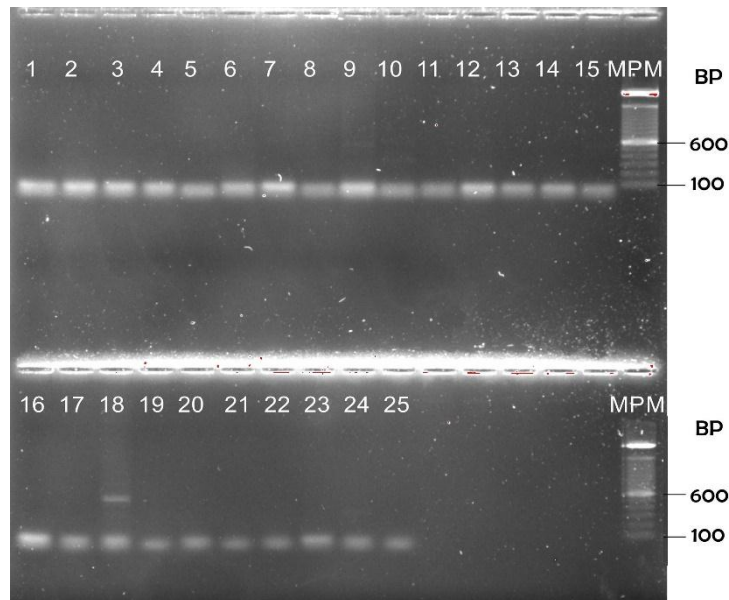


Figura 8: Detección de los amplicones de ADN (485 bp) de CaHV-1 en los carriles 9 y 18. Carril 25; control negativo. Carriles extremos derechos; Marcadores de Peso molecular de 100 bp

Del total de muestras positivas ($n=9$) a la detección del virus CaHV-1, 1 corresponden a muestras de hisopados nasales, 5 de los hisopados genitales y 3 de los tejidos obtenidos (Tablas 8 y 9).

4.4 Distribución de las muestras positivas según edad, sexo y raza.

Las muestras positivas a la detección del virus CaHV-1 se encuentran distribuidas indistintamente la edad, el sexo o la raza según los resultados, correspondiendo a 5 muestras positivas localizadas en perros menores de 1 año, 4 en perros mayores a un año, 3 en machos, 3 en hembras, 3 en no identificados el sexo, 5 en mestizos y 4 en perros de raza (Tabla 10).

Así mismo se obtiene un gráfico detallando el tipo de muestra en donde se han obtenidos los resultados positivos correspondiendo a hisopados nasales ($n=1$), hisopados genitales ($n = 5$) y muestras de tejidos ($n =3$) (Tablas 8 y 9).



Tabla 10: Distribución de las muestras positivas según sexo, edad o raza.

Sexo		Edad				Raza		
Macho	Hembra	Fetos	0-4 Semanas	4 -52 semanas	≥ 1 años	Bulldog Ingles	Beagle	Mestizo
3	3	3	0	2	4	3	1	5



5. DISCUSIÓN

En esta investigación se tuvo como objetivo emplear un ensayo PCR que pueda ser validado para la detección de CaHV-1, como bien se logró en otras investigaciones dirigidas por Larsen (57) y Decaro (58) con una variante en tiempo real. Esto debido a que este virus es de gran importancia en el área veterinaria ya que genera importantes cuadros clínicos en los perros que pueden llegar a la muerte en los neonatos y desde lesiones leves hasta problemas reproductivos en adultos además de estados de latencia y en el acervo bibliográfico consultado no se tiene ningún tipo de reporte en Ecuador lo que hace que se excluya al virus del diagnóstico diferencial en muchas ocasiones.

Actualmente la prueba (PCR) sirve de confirmación de diagnóstico, ya que se trata de una prueba directa, identifica el genoma viral de diferentes tipos de muestras incluidas las congeladas hace tiempo atrás, siendo el método PCR el método de elección para el diagnóstico del CaHV-1 como lo expresa Dumon (6). Especialmente por su capacidad de generar estados de latencia lo cual hace sugerir el uso de pruebas PCR para su detección en estos casos.

En esta investigación se usó una curva de temperatura de alineamiento de 50°C que contrasta con los 56°C que Miyoshi (52) usó para su investigación con el mismo set de primers IE-1 e IE-2 usados. Esto también contrasta con otras investigaciones como la de Chutchai (59) en donde fue de 58°C en la que no se detectaron amplicones inespecíficos, esto puede ser debido a los diferentes primers usados.

Chutchai (59,60) en diversos estudios probó la especificidad del test de PCR, haciendo los ensayos en muestras que contenían el CaHV-1, mezclado con otros patógenos y teniendo únicamente amplicones específicos del CaHV-1 detectados. Para evaluar la reproductibilidad, las variaciones inter e intraensayo revelaron resultados similares entre los ensayos.

Para evaluar el ensayo de PCR de esta investigación se recolectó muestras de tejidos en donde se conoce que el virus tiene mayor tropismo como lo indica Miyoshi (52) en sus estudios, Chutchai (60) y Decaro (58). Se determinó así a los hisopados nasales y



genitales (vaginales y prepuciales) como muestras *ante-mortem* y a los tejidos renales y de ganglio nervioso trigémino como muestras *post-mortem*.

Se encontraron 9 muestras positivas de distintos individuos dando una frecuencia del 8,91% permitiendo así generar el primer reporte del virus CaHV-1 en Ecuador y ubicándolo en un rango similar al de Estados Unidos (6%) o Alemania (9-22%) como informó Ledbetter (5) teniendo en cuenta que no es una investigación netamente epidemiológica.

De las muestras positivas se debe recalcar que son de diferentes individuos, es decir, ningún individuo presentó las dos muestras tomadas como positivas. Esto concuerda, en cierta medida con lo expuesto por Chutchai (60) en donde se llevó a cabo una investigación y de los 32 perros estudiados que dieron positivo a la herpesvirosis, 17 perros (53.1%) dieron positivo para ambas muestras nasal y oral, teniendo 9 perros que fueron positivos en las muestras nasales (28.1%) y 6 perros positivos en las muestras orales (18.8%).

La mayoría de los positivos de los hisopados, en esta investigación, fueron de la mucosa genital, y solo 1 nasal, concordando con la información de que en adultos el virus tiene mayor tropismo en esas mucosas para la replicación, así mismo Chutchai (59) en sus investigaciones en el 2016 encontró más casos positivos cuando las muestras fueron hisopados orofaríngeos que los nasales, debido a que se replica el virus en vías respiratorias bajas preferentemente. También se coincidió en que se generaba el primer reporte para el virus CaHV-1 en Tailandia.

También es importante remarcar que de los 3 positivos de muestras *post-mortem* en ninguno se pudo evidenciar las lesiones típicas que se describen para la infección por CaHV-1. Resultados similares se encontraron en estudios llevados a cabo por Larsen (57) en donde solo un cachorro presentó lesiones concurrentes con la infección por el virus CaHV-1, es decir hepatomegalia, esplenomegalia y renomegalia bilateral asociada con hemorragias generalizadas. Además, histológicamente identificaron cuerpos de inclusión eosinofílicos intranucleares en la corteza renal.

Se sabe que la infección por CaHV-1 es indistinto de la edad, sexo o raza como lo muestran nuestros resultados y también un estudio realizado por Ronsse (61).



Finalmente, la no detección del virus en muestras de hisopados se puede deber a estados de latencia en varios ganglios nerviosos, en donde puede haber baja carga viral o falló a la toma de muestra como lo expresa Burr (50), lo cual puede traducirse en falsos negativos. Así también lo describe Chutchai (59) y Miyoshi (52) en 1998 reporta que en perros con infecciones latentes, inoculados por diferentes rutas el virus, no se pudo detectar en hisopados nasales ni vaginales.



6. CONCLUSIONES

Para elaborar esta investigación se obtuvieron 202 muestras biológicas, correspondientes a hisopados genitales y nasales en muestras *ante-mortem* y tejidos fetales en muestras *post-mortem* de 101 perros indistintamente su edad, raza o sexo de diferentes puntos de la ciudad de Cuenca, para ser sometidas a un procesamiento y análisis en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

Debido al ensayo de PCR instaurado para realizar el control de proceso se pudo determinar la validez de las 181 muestras en donde sí se pudo obtener el material genético amplificado deseado. Esto nos permite afirmar con certeza que en las muestras en donde se obtuvo resultados negativos a la amplificación del material genético de CaHV-1 son negativos porque precisamente no hay la presencia del agente o porque la cantidad presente es menor a lo detectable, pero por ningún motivo son negativos debido a alguna situación que dañen las muestras e interfieran con la detección de CaHV- 1.

En la presente investigación obtuvimos 9 muestras con resultado positivo a la detección de material genético de CaHV-1 correspondientes a las 202 muestras y esto permite generar el primer reporte del virus CaHV-1 en Ecuador.



7. PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES

Con la realización de esta investigación en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca se tienen ya establecidos los protocolos para llevar a cabo con éxito la detección del virus CaHV-1, responsable de muertes neonatales, infertilidad, abortos y problemas respiratorios en perros, con técnicas moleculares como el PCR y se podría desarrollar protocolos de profilaxis para la diseminación del virus. También herramientas terapéuticas como vacunas entre otras.

A partir de esto, se sugiere más investigaciones en donde se pueda enfocar, incluso, en la epidemiología del virus CaHV-1 ampliando el número de datos para analizar mejor la frecuencia de este virus que afecta a los perros en Ecuador.



8. BIBLIOGRAFÍA

1. Galosi C. Herpesvirus Canino 1: Agente Etiológico y Enfermedad. *Analecta Veterinaria* [Internet]. 2007;27(2):28–35. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11202/Documento_completo_.pdf?sequence=1
2. NCBI. Canid alphaherpesvirus [Internet]. Taxonomy Browser. 2018 [citado 2018 Nov 16]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=170325&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
3. De Palma V. El Herpesvirus canino-1 (CaHV-1) como posible agente etiológico de trastornos respiratorios y reproductivos en la república Argentina [Internet]. La Plata; 2010. Disponible en: http://www.fcv.unlp.edu.ar/images/stories/sec_posgrado/tesis/2011/DePalmaViviana_TesisDoctoralFinal.pdf
4. Carmichael L, Strandberg J, Barnes F. Identification of a cytopathogenic agent infectious for puppies as a canine herpesvirus. *Proc Soc Exp Biol Med* [Internet]. 1965;120:644–650. DOI: 10.3181/00379727-120-30614
5. Ledbetter E. Canine Herpesvirus-1 ocular disease of mature dogs. *New Zel Vet J* [Internet]. 2013;61(4):193–201. DOI: 10.1080/00480169.2013.768151
6. Dumon. Canine mortality in neonates related to specific infectious diseases: brucellosis, canine herpesvirus, mycoplasmal infection. *EMC-Vétérinaire* [Internet]. 2005;2(2):54–62. DOI: 10.1016/j.emcvet.2004.12.001
7. Wiebe V. *Drug therapy for infectious diseases of the dog and cat*. Iowa: WILEY Blackweel; 2015. 80 p.
8. Fuentes A. Determinación del Gen UL37 del Virus Herpes mediante la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR) [Internet]. Santiago de Chile; 2010. Disponible en: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131219/Determinación-del-gen-UL37-del-virus-herpes-canino-mediante-la-reacción-de-la-polimerasa-en>
Andrés Alberto Reyes Zumba – Joaquin Alberto Macancela Oña



cadena.pdf?sequence=1

9. Skyes J. Canine and feline infectious diseases. St. Lois: ELSEVIER; 2013. 166-168 p.
10. Kumar S, Driskell E, Cooley A, Jia K, Blacmon S, Wan X, et al. Fatal canid herpesvirus i respiratory infections in 4 clinically healthy adult dogs. Vet Pathol [Internet]. 2015;52(4):681–687. DOI: 10.1177/0300985814556190
11. Papageorgiou K, Suárez N, Wilkie G, McDonald M, Graham E, Davison A. Genome sequence of canine herpesvirus. PLoS One [Internet]. 2016;11(5):1–11. DOI: 10.1371/journal.pone.0156015
12. Maclechlan J, Dubovi E. Fenner’s veterinary virology. Quinta. Maclechlan J, Dubovi E, editors. London: Academic Press; 2016. 202 p.
13. Agerholm J. Canine Herpesvirus-1 infection in neonatal dogs [Internet]. Copenhagen; 2013. Disponible en : https://www.dkk.dk/uploads/documents/Rådgivning/Specialer/Canine_Herpesvirus.pdf
14. Nakamichi K, Ohara K, Matsumoto Y, Otsuka H. Attachment and penetration of canine herpesvirus 1 in non-permissive cells. J Vet Med Sci [Internet]. 2000;62(9):965–970. DOI: 10.1292/jvms.62.965
15. Decaro N, Martella V, Buonavoglia C. Canine Adenovirus and Herpesvirus. Vet Clin North América Small Anim Pract [Internet]. 2008;38(4):799–814. DOI: 10.1016/j.cvsm.2008.02.006
16. Guy J. Diagnosis of canine viral infections. Vet Clin North Am Small Anim Pract [Internet]. 1986;16(6):1145–1156. DOI: 10.1016/S0195-5616(86)50133-9
17. Mantziaras G, Teliousis K, Mavropoulou O, Pseftogas A, Luvoni GC. First documented report of CHV-1 infection of a pregnant bitch in Greece [Internet]. Paris; 2016. Disponible en: <https://www.ivis.org/proceedings/iscfr/2016/149.pdf?LA=1>
18. Xuan X, Horimoto T, Limcumpao J, Tohya Y, Takahashi E, Mikami T.



- Glycoprotein-specific immune response in canine herpesvirus infection. *Arch Virol* [Internet]. 1992;122(3–4):359–65. DOI: 10.1007/BF01317197
19. Ledbetter E, Kim K, Dubovi E, Mohammed H. Clinical and immunological assessment of therapeutic immunization with a subunit vaccine for recurrent ocular canine herpesvirus-1 infection in dogs. *Vet Microbiolgy* [Internet]. 2016;192:102–110. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.11.011
 20. Poulet H, Guigal P, Soulier M, Leroy V, Fayet G, Minke J, et al. Protection of puppies against canine herpesvirus by vaccination of the dams. *Vet Rec* [Internet]. 2001;148(22):691–695. DOI: 10.1136/vr.148.22.691
 21. Rijsewijk F, Luiten E, Daus F, van der Heijden R, van Oirschot J. Prevalence of antibodies against canine herpesvirus 1 in dogs in The Netherlands in 1997-1998. *Vet Microbiolgy* [Internet]. 1999;65(1):1–7. DOI: 10.1016/S0378-1135(98)00285-5
 22. Takumi A, Kusanagi K, Tuchiya K, Xuan X, Azetaka M, Takahashi E. Serodiagnosis of Canine Herpesvirus infection-development of an enzyme-linked immunosorbent assay and its comparison with two improved methods of serum neutralization test. *Japanese J Vet Sci* [Internet]. 1990;52(2):241–250. DOI: 10.1292/jvms1939.52.241
 23. Fontbonne A. L'Herpésivrose Canine. *Bull Vet Acad Fr* [Internet]. 2011;164(4):331–340. DOI: /10.1292/jvms1939.52.241
 24. Greene C. *Infectiou Diseases of the Dog and Cat. Cuarta. St. Lois: ELSEVIER; 2012. 48-54 p.*
 25. Hashimoto A, Hirai K, Yamaguchi T, Fujimoto Y. Experimental transplacental infection of pregnant dogs with canine herpesvirus. *Am J Vet Res* [Internet]. 1982;43(5):844–850. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/6283965/>
 26. Kawakami K, Ogawa H, Maeda K, Imai A, Ohashi E, Matsunaga S, et al. Nosocomial outbreak of serious canine infectious tracheobroc (Kennel Cough) caused by Canine Herpesvirus infection. *J Clin Microbiol* [Internet].



- 2010;48(4):1176–1181. DOI: 10.1128/JCM.02128-09
27. Carrasco L. Detección del gen de la glicoproteína B del virus herpes canino a través de la reacción de la polimerasa en cadena [Internet]. Santiago de Chile; 2010. Disponible en: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131163/Detección-del-gen-de-la-glicoproteína-B-del-virus-herpes-canino-a-través-de-la-reacción-de-la-polimerasa-en-cadena.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 28. Carmichael L. Neonatal Viral Infections of Pups: Canine Herpesvirus and minute virus of canines (Canine Parvovirus-1) [Internet]. Ithaca; 2004. Disponible en: <http://www.ivis.org/docarchive/A0102.0899.pdf>
 29. Blanco M, Gibello A, Cutuli MT, Gómez M, Domínguez G, Dómenech A, et al. Manual gráfico inmunología y enfermedades infecciosas del perro y el gato. Zaragoza: SERVET; 2013. 78-79 p.
 30. Ronsse V, Verstegen J, Onclin K, Farnir F, Poulet H. Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1). *Theriogenology* [Internet]. 2004;61(4):619–636. DOI: 10.1016/S0093-691X(03)00249-8
 31. Evermann J, Ledbetter E, Maes R. Canine reproductive, respiratory, and ocular diseases due to canine herpesvirus. *Vet Clin Small Anim Pract* [Internet]. 2011;41(6):1092–1120. DOI: 10.1016/j.cvsm.2011.08.007
 32. Pratelli A, Losurdo C. Serological and virological detection of canine herpesvirus-1 in adult dogs with and without reproductive disorders. *Vet J* [Internet]. 2014;200:257–260. DOI: 10.1016/j.tvjl.2014.03.001
 33. Morgan R. Practice, Handbook of small animal. 5th ed. St. Louis: ELSEVIER; 2007. 1090-1091 p.
 34. Li Y, Negussie H, Qiu Y, Reddy V, Mateusen B. Early events of canine herpesvirus 1 infections in canine respiratory and genital mucosae by the use of ex vivo models. *Res Vet Sci* [Internet]. 2016;105:205–208. DOI: 10.1016/j.rvsc.2016.02.019



35. Haanes E, Tomlison C. Genomic organization of the canine herpesvirus US region. PLoS One [Internet]. 1997;53:151–162. DOI: 10.1371/journal.pone.0156015
36. Gradil C, Yeager A, Concannon P. Assessment of reproductive problems in the male dog. Ithaca; 2006.
37. Navarro C, Celedón M, Pizarro J. Detección de virus herpes canino tipo 1 en Chile. Arch Med Vet [Internet]. 2003;35(2):227–231. DOI: 10.4067/S0301-732X2003000200010
38. Peterson M, Kutzler M. Small animal pediatrics, the first 12 months of life. St. Lois: ELSEVIER; 2011. 122-123 p.
39. Sowman H, Cave N, Dunowska M. A survey of canine respiratory pathogens in New Zealand dogs. New Zel Vet J [Internet]. 2008;66(5):236–242. DOI: 10.1080/00480169.2018.1490214
40. Carter G, Wise D, Flores E. Virología veterinaria [Internet]. Ithaca; 2005. Disponible en: <http://www.vet.unicen.edu.ar/ActividadesCurriculares/Virologia/images/Documentos/2009/VIROLOGIA VETERINARIA.pdf>
41. Mason J, Sloma E, Shelton M, Miller A. Naturally acquired Canine Herpesvirus-associated meningoencephalitis. Vet Pathol [Internet]. 2017;54(5):820–827. DOI: 10.1177/0300985817716263
42. Morresey P. Reproductive effects of Canine Herpesvirus. Compend Continuing Educ Pract Vet [Internet]. 2004;26(10):804–911. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/287884931_Reproductive_effects_of_canine_herpesvirus
43. Carmichael L, Barnes F, Percy D. Temperature as a factor in resistance of young puppies to Canine Herpesvirus. J of Infectious Dis [Internet]. 1969;120(6):669–678. DOI: 10.1093/infdis/120.6.669
44. Durán F. Enfermedades en perros y gatos. Bogotá: Grupo Latino; 2010. 310-312



- p.
45. Schaer M. Medicina Clínica del perro y el gato. Barcelona: ELSEVIER; 2006. 882-883 p.
 46. Ramsey I, Bryn T. Manual de Enfermedades infecciosas en pequeños animales. Barcelona: Ediciones S; 2012. 261 p.
 47. Percy D, Carmichael L, Albert D, King J, Jonas A. Lesions in puppies surviving infection with canine herpesvirus. Vet Pathol [Internet]. 1971;8:37–53. DOI: 10.1177/030098587100800106
 48. Khan C, editor. Manual Merck de veterinaria. Sexta. Barcelona: Océano; 2007. 615-616 p.
 49. Angulo S. Medicina pediátrica en pequeños animales. Zaragoza: SERVET; 2013. 232-234 p.
 50. Burr P, Campbell M, Nicolson L, Onions D. Detection of Canine Herpesvirus 1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction. Vet J [Internet]. 1996;189(1):227–237. DOI: 10.1016/S0378-1135(96)01227-8
 51. Ledbetter E. State of the Art: Canine Herpesvirus-1 Ocular disease in mature dogs [Internet]. 2013 [cited 1BC Nov 14]. Disponible en: <https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?pld=11372&catId=35315&id=5709768&ind=251&objTypeID=17&print=1>
 52. Miyoshi M, Ishii Y, Takiguchi M, Takada A, Jasuda J, Hashinmoto A, et al. Detection of Canine Herpesvirus DNA in the ganglionic neurons and the lymph node lymphocytes of latently infected dogs. J Vet Med Sci [Internet]. 1999;61(4):375–379. DOI: 10.1292/jvms.61.375
 53. Bartlett J, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. Methods Mol Biol [Internet]. 2003;226(1):3–6. DOI: 10.1385/1-59259-384-4:3
 54. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investig en Discapac [Internet]. 2003;2(2):70–78. Disponible en:



<http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>

55. Velasco R, López M, Saavedra M. La reacción en cadena de la polimerasa y su aplicación al diagnóstico de laboratorio de las enfermedades bacterianas [Internet]. Ciudad de México; 2005. Disponible en: <http://depa.fquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-PCR.pdf>
56. Smith RF, Yamashiroya HM, Magis JM. Recovery of a canine herpesvirus from primary kidney cultures derived from a closed dog colony. *Appl Microbiol* [Internet]. 1970;20(3):523–526. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC376975/pdf/applmicro00107-0253.pdf>
57. Larsen R, Kiupel M, Balzer H-J, Agerholm J. Prevalence of canid herpesvirus-1 infection in stillborn and dead neonatal puppies in Denmark. *Acta Vet Scand* [Internet]. 2015;57(1):1–7. DOI: 10.1186/s13028-014-0092-9
58. Decaro N, Amorisco F, Desario C, Lorusso E, Camero M, Bellacicco A, et al. Development and validation of a real-time PCR assay for specific and sensitive detection of canid herpesvirus 1. *J Virol Methods* [Internet]. 2010;169(1):176–180. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.07.021
59. Chutchai P, Anudep R, Yong P, Techangamsuwan S. Development and application of multiplex PCR assays for detection of virus-induced respiratory disease complex in dogs. *J Vet Med Sci* [Internet]. 2016;78(12):1847–54. DOI: 10.1292/jvms.16-0342
60. Chutchai P, Anudep R, Yong P. Viral molecular and pathological investigations of Canid herpesvirus 1 infection associated respiratory disease and acute death in dogs. *Acta Vet Brno* [Internet]. 2017;67(1):11–24. DOI: 10.1515/acve-2017-0002
61. Ronsse V, Verstegen J, Onclin K, Guiot A, Aeberlé C, Nauwynck H, et al. Seroprevalence of Canine Herpesvirus-1 in the Belgian dog population in 2000. *Reprod Domest Anim* [Internet]. 2008;37(5):299–304. DOI: 10.1016/S0093-691X(03)00249-8



Signología presente en los animales de la toma de muestra.

Menores de 4 semanas	Mayores a 4 semanas	Adultos
1 Mortalidad	10 Rinitis	13 Conjuntivitis transitoria
2 Trastornos digestivos	11 Conjuntivitis	14 Tos de las perreras
3 Anorexia	12 Faringitis	15 Vaginitis vesicular
4 Heces líquidas (gris)		16 Inf. uterinas (último tercio de gestación)
5 Vómitos y salivación		17 Descarga vaginal
6 Dolor abdominal		18 Infertilidad
7 Coma y muerte		19 Abortos
8 Letargia		20 Nódulos en pene
9 Convulsión		21 Petequias del pene
		22 Secreción purulenta

|



Anexo 2: Formato de ensayo de PCR para la amplificación de material genético del control de proceso.

<p>UNIVERSIDAD DE CUENCA desde 1867</p>	Laboratorio de Biología Molecular		01-FE-MBM-TaqPol	
	Formato de ensayo: <i>Taq</i> ADN polimerasa		Versión: 1.1 Fecha: 2016.08.23 Página: 1 de 2	

A.- Información del ensayo:

Usuario: _____

Fecha: 2018.05.28 Nombre del programa: _____

No:	Nombre del producto de PCR:	Tamaño (bp):	Observaciones:
1	Dag CyB	808	Control de proceso
2			
3			
4			
5			

B.- Mezcla de reacción:

Reactivo:	Concentración		Volumen	
	inicial:	final:	de premezcla:	por reacción:
Agua grado Biología Molecular.	No aplica.	No aplica.	90.95 µl	_____ µl
Tampon de amplificación 10X.	10X	1X	12.5 µl	_____ µl
Solución de dNTP's.	_____ mM	_____ mM	5 µl	_____ µl
Solución de MgCl ₂ .	_____ mM	_____ mM	1.25 µl	_____ µl
Oligonucleotido DOGCyB -F.	_____ µM	_____ µM	1 µl	_____ µl
Oligonucleotido DOGCyB -R.	_____ µM	_____ µM	1 µl	_____ µl
Oligonucleotido _____ -F.	_____ µM	_____ µM	_____ µl	_____ µl
Oligonucleotido _____ -R.	_____ µM	_____ µM	_____ µl	_____ µl
Oligonucleotido _____ -F.	_____ µM	_____ µM	_____ µl	_____ µl
Oligonucleotido _____ -R.	_____ µM	_____ µM	_____ µl	_____ µl
Enzima <i>Taq</i> ADN polimerasa.	_____ U/µl	_____ U/µl	1 µl	_____ µl
Muestra de ADN total.	_____ µg/µl	_____ µg/µl	12.5 µl	_____ µl
Volumen final:	_____	_____	12.5 µl	102 µl

C.- Perfil de temperaturas de amplificación:

Paso:	Desnaturalización inicial:	Número de ciclos: _____			Extensión final:	Almacenamiento:
		Desnaturalización:	Alineamiento:	Extensión:		
Tiempo (min , seg ' '):	5' "	30' "	25' "	45' "	5' "	∞
Temperatura (°C):	94.0 °C	94.0 °C	55 °C	72 °C	72 °C	4 °C

D.- Curva de temperatura de alineamiento:

No:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TM (°C):												
Tubo No.:												
Tubo No.:												
Tubo No.:												

F001- PCR Taqpol ver2016.08.23.odt Página 1 de 2



Anexo 3: Formato de ensayo de PCR para la amplificación de material genético del virus CaHV-1.

21

 UNIVERSIDAD DE CUENCA FUNDADA 1927	Laboratorio de Biología Molecular	01-FE-MBM-TaqPol	
	Formato de ensayo: Taq ADN polimerasa	Versión: 1.1 Fecha: 2016.08.23 Página: 1 de 2	

A.- Información del ensayo:

Usuario:		
Fecha: 2018.05.06	Nombre del programa:	
No: Nombre del producto de PCR:	Tamaño (bp):	Observaciones:
1 IE-1-2	492-495	
2		
3		
4		
5		

B.- Mezcla de reacción:

Reactivo:	Concentración		Volumen	
	inicial:	final:	de premezcla:	por reacción:
Agua grado Biología Molecular.	No aplica.	No aplica.	90.35 µl	µl
Tampon de amplificación 10X.	10X	1X	12.5 µl	µl
Solución de dNTP's.	mM	mM	5 µl	µl
Solución de MgCl ₂ .	mM	mM	1.25 µl	µl
Oligonucleótido IE-1 -F.	µM	µM	1 µl	µl
Oligonucleótido IE-2 -R.	µM	µM	1 µl	µl
Oligonucleótido -F.	µM	µM	µl	µl
Oligonucleótido -R.	µM	µM	µl	µl
Oligonucleótido -F.	µM	µM	µl	µl
Oligonucleótido -R.	µM	µM	µl	µl
Enzima Taq ADN polimerasa.	U/µl	U/µl	1 µl	µl
Muestra de ADN total.	µg/µl	µg/µl	12.5 µl	µl
Volumen final:			115 µl	10 µl

C.- Perfil de temperaturas de amplificación:

Paso:	Desnaturalización inicial:	Número de ciclos: 40				Extensión final:	Almacenamiento:
		Desnaturalización:	Alincamiento:	Extinción:			
		Tiempo (min, seg):	Temperatura (°C):	Tiempo (min, seg):	Temperatura (°C):		
	5' "	35"	25"	30"	5' "	"	
	94.0 °C	94.0 °C	50.0 °C < 60.0 °C	72.0 °C	72.0 °C	4 °C	

D.- Curva de temperatura de alineamiento:

No:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TM (°C):	50.0	50.3	50.9	51.2	53.1	54.4	55.6	56.4	58.2	59.1	59.2	60.0
Tubo No.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tubo No.:												
Tubo No.:												

F001- PCR Taqpol ver2016.08.23.odt Página 1 de 2



Anexo 4: Fórmula aplicada para la estimación de las probabilidades

$$\rho = \frac{x}{n} \quad q = 1 - \rho \quad \rho - Z \left(\sqrt{\frac{\rho q}{n}} \right) < \rho < \rho + Z \left(\sqrt{\frac{\rho q}{n}} \right)$$

Resultados por categorías:

Muestras de clínicas *ante-mortem*

$$\rho = \frac{0}{58} = 0$$

Interpretación: No hay probabilidades de encontrar casos positivos a infección por CaHV-1 en clínicas caninas en muestras *ante-mortem*.

Muestras de criaderos *ante-mortem*

$$\rho = \frac{3}{28} = 0.107$$

$$q = 1 - 0.107 = 0.893$$

$$0.107 - 1.96 \left(\sqrt{\frac{0.107 \times 0.893}{28}} \right) < \rho < 0.107 + 1.96 \left(\sqrt{\frac{0.107 \times 0.893}{28}} \right) =$$

$$0.107 - 1.96(0.0584) < \rho < 0.107 + 1.96(0.0584) =$$

$$0.107 - 0.1145 < \rho < 0.107 + 0.1145 =$$

$$0.0075 < \rho < 0.2215$$

Interpretación: Las probabilidades de encontrar casos positivos a infección por CaHV-1 en criaderos van desde el 0,0075 al 0,2215% en muestras *ante-mortem*.

Muestras de refugios *ante-mortem*

$$\rho = \frac{0}{10} = 0$$

Interpretación: No hay probabilidades de encontrar casos positivos a infección por CaHV-1 en refugios de perros en muestras *ante-mortem*.

Muestras de Otros *ante-mortem*

$$\rho = \frac{3}{82} = 0.0366$$



$$q = 1 - 0.0366 = 0.9634$$

$$0.0366 - 1.96 \left(\sqrt{\frac{0.0366 \times 0.9634}{82}} \right) < \rho < 0.0366 + 1.96 \left(\sqrt{\frac{0.0366 \times 0.9634}{82}} \right) =$$

$$0.0366 - 1.96(0.0207) < \rho < 0.0366 + 1.96(0.0207) =$$

$$0.0366 - 0.0406 < \rho < 0.0366 + 0.0406 =$$

$$0.004 < \rho < 0.0772$$

Interpretación: Las probabilidades de encontrar casos positivos a infección por CaHV-1 en otros lugares, como los hogares, van desde el 0,004 al 0,0772% en muestras *ante-mortem*.

Total *ante-mortem*

$$\rho = \frac{6}{178} = 0.0337$$

$$q = 1 - 0.0337 = 0.9663$$

$$0.0337 - 1.96 \left(\sqrt{\frac{0.0337 \times 0.9663}{178}} \right) < \rho < 0.0337 + 1.96 \left(\sqrt{\frac{0.0337 \times 0.9663}{178}} \right) =$$

$$0.0337 - 1.96(0.0135) < \rho < 0.0337 + 1.96(0.0135) =$$

$$0.0337 - 0.0265 < \rho < 0.0337 + 0.0265 =$$

$$-0.0072 < \rho < 0.0602$$

Interpretación: Las probabilidades de encontrar casos positivos a infección por CaHV-1 en otros individuos vivos van desde el -0,0072 al 0,0602% en muestras *ante-mortem*.

Muestras de clínicas *post-mortem*

$$\rho = \frac{3}{20} = 0.15$$

$$q = 1 - 0.15 = 0.85$$

$$0.15 - 1.96 \left(\sqrt{\frac{0.15 \times 0.85}{20}} \right) < \rho < 0.15 + 1.96 \left(\sqrt{\frac{0.15 \times 0.85}{20}} \right) =$$

$$0.15 - 1.96(0.0798) < \rho < 0.15 + 1.96(0.0798) =$$

$$0.15 - 0.1565 < \rho < 0.15 + 0.1565$$

$$0.0065 < \rho < 0.3065$$



Interpretación: Las probabilidades de encontrar casos positivos a infección por CaHV-1 en clínicas van desde el 0,0065 al 0,3065% en muestras *post-mortem*

Muestras de Otros *post-mortem*

$$\rho = \frac{0}{4} = 0$$

Interpretación: No hay probabilidades de encontrar casos positivos a infección por CaHV-1 en otros lugares, como hogares, en muestras *post-mortem*.

Total *post-mortem*

$$\rho = \frac{3}{24} = 0.125$$

$$q = 1 - 0.125 = 0.875$$

$$0.125 - 1.96 \left(\sqrt{\frac{0.125 \times 0.875}{24}} \right) < \rho < 0.125 + 1.96 \left(\sqrt{\frac{0.125 \times 0.875}{24}} \right) =$$

$$0.125 - 1.96(0.0675) < \rho < 0.125 + 1.96(0.0675) =$$

$$0.125 - 0.1323 < \rho < 0.125 + 0.1323 =$$

$$0.0073 < \rho < 0.2573$$

Interpretación: Las probabilidades de encontrar un caso positivo a infección por CaHV-1 en individuos muertos van desde el 0,0073 al 0,2573%

Muestras de hisopados nasales *ante-mortem*

$$\rho = \frac{1}{89} = 0.0112$$

$$q = 1 - 0.0112 = 0.9888$$

$$0.12 - 1.96 \left(\sqrt{\frac{0.0112 \times 0.988}{89}} \right) < \rho < 0.12 + 1.96 \left(\sqrt{\frac{0.0112 \times 0.988}{89}} \right) =$$

$$0.0112 - 1.96(0.0112) < \rho < 0.0112 + 1.96(0.0112) =$$

$$0.0112 - 0.0219 < \rho < 0.0112 + 0.0219 =$$

$$0.0107 < \rho < 0.0331$$

Interpretación: Las probabilidades de encontrar un caso positivo a infección por CaHV-1 en muestras de hisopados nasales van desde el 0,0107 al 0,0331%



Muestras de hisopados genitales *ante-mortem*

$$\rho = \frac{5}{89} = 0.0562$$

$$q = 1 - 0.0562 = 0.9438$$

$$0.0562 - 1.96 \left(\sqrt{\frac{0.0562 \times 0.9438}{89}} \right) < \rho < 0.0562 + 1.96 \left(\sqrt{\frac{0.0562 \times 0.9438}{89}} \right) =$$

$$0.0562 - 1.96(0.0244) < \rho < 0.0562 + 1.96(0.0244) =$$

$$0.0562 - 0.0478 < \rho < 0.0562 + 0.0478 =$$

$$-0.0084 < \rho < 0.104$$

Interpretación: Las probabilidades de encontrar un caso positivo a infección por CaHV-1 en muestras de hisopados genitales van desde el – 0,0084 al 0,104%.

Muestras de tejido renal *post-mortem*

$$\rho = \frac{3}{12} = 0.25$$

$$q = 1 - 0.25 = 0.75$$

$$0.25 - 1.96 \left(\sqrt{\frac{0.25 \times 0.75}{12}} \right) < \rho < 0.25 + 1.96 \left(\sqrt{\frac{0.25 \times 0.75}{12}} \right) =$$

$$0.25 - 1.96(0.125) < \rho < 0.25 + 1.96(0.125) =$$

$$0.25 - 0.245 < \rho < 0.25 + 0.245 =$$

$$-0.005 < \rho < 0.495$$

Interpretación: Las probabilidades de encontrar un caso positivo a infección por CaHV-1 en muestras de tejido renal van desde el –0,005 al 0,0495%.

Muestras de tejido de ganglio *post-mortem*

$$\rho = \frac{0}{12} = 0$$

Interpretación: Las probabilidades de encontrar un caso positivo a infección por CaHV-1 en muestras de ganglio retrofaríngeo son nulas.