

## Detección de virus herpes canino tipo 1 en Chile\*

### Canine herpesvirus-1 detection in Chile

C. NAVARRO<sup>1</sup>, BQ.; M. CELEDÓN<sup>1</sup>, M.V., M.Cs.; J. PIZARRO<sup>1</sup>, BQ., Dr. Cs.

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile,  
Casilla 2, Correo 15, Santiago, Chile. E-mail: canavarr@uchile.cl

#### SUMMARY

This work reports the detection of canine herpesvirus type 1 (CHV-1) in Chile, confirming the strong clinical suspicion of its existence. A viral isolate, RP5, was obtained from diagnosed clinical cases such as hemorrhagic diseases of puppies. This viral isolate was inoculated in cell monolayers and produced the typical cytopathic effect of members of the *Alphaherpesvirinae* subfamily, *Herpesviridae* family: cellular lysis in a short period of time. This viral isolate demonstrated its effect in primary cultures of canine lung and canine kidney, and also in the MDCK cell line. This effect was lost due to prior incubation of the inoculate with an organic solvent, therefore the adenovirus presence was ruled out. As a specific confirmation of VHC-1 presence, a direct fluorescence test in inoculated cell cultures was carried out using monoclonal antibody anti CHV-1, fluorescein isothiocyanate conjugated (VMRD, Inc.) whose results suggest the presence of the virus. It is of great importance to determine the presence of the virus because the isolation and characterization of the virus will allow to carry out future investigations. This includes the evaluation of the magnitude of infection in the canine population and obtaining information about virus infection repercussion in reproductive places. It may also be the challenge of diagnostic design of laboratory methods such as immunofluorescence, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Polymerase Chain Reaction (PCR). In addition it may be possible to devise strategies in order to develop an eventual vaccine.

*Key words:* canine herpesvirus, cytopathic effect (CPE), direct immunofluorescence.

*Palabras claves:* virus herpes canino, efecto citopático (ECP), inmunofluorescencia directa.

#### INTRODUCCION

El virus herpes canino tipo 1 (VHC-1) es el agente causal de la enfermedad hemorrágica mortal en cachorros menores de 4 semanas, abortos y también infecciones del tracto respiratorio superior y de la mucosa externa del aparato genital en adultos. Si bien esta enfermedad fue descrita por primera vez en Estados Unidos de Norteamérica (Carmichael y col., 1965), existen otros informes que le otorgan

presentación mundial (Ratud y Werner, 1967; Huxtable y Farrow, 1970; Thompson y col., 1972; Reading y Field, 1998).

El VHC-1 pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, del cual sólo se conoce un serotipo (Manning y col., 1988), existiendo algunos trabajos en los cuales se ha investigado parte del genoma de este virus (Xuan y col., 1990; Xuan y col., 1996; Burr y col., 1996). La subfamilia *Alphaherpesvirinae* incluye cepas virales capaces de realizar ciclos líticos en las células que infectan, son de propagación rápida, con un amplio rango de hospedadores y producen infecciones latentes, principalmente en los ganglios nerviosos (Boehmer y Lehman, 1997).

Aceptado: 19.08.2003.

\* Proyecto FIV-3634. Dirección de Investigación FAVET, Universidad de Chile. Departamento de Postgrado y Postítulo, Universidad de Chile.

Se sabe que tanto en la consulta privada de pequeños animales como en planteles reproductores este cuadro clínico ha estado presente, si bien no es un motivo de consulta de rutina, existe. La presencia de este virus en nuestro país ha sido sugerida por hallazgos clínicos que incluyen principalmente muerte neonatal. En estos cachorros, al realizar la necropsia se evidenciaron lesiones típicas de virus herpes y la histopatología del hígado demostró cuerpos de inclusión intranucleares. Sin embargo, el aislamiento no fue informado, a pesar de evidenciar lisis en las células inoculadas (Larenas y col., 1992). Actualmente, este cuadro clínico se ha manifestado en repetidas ocasiones, afectando a camadas enteras en el Área Metropolitana, según información proporcionada por profesionales del área privada y por casuística en el Departamento de Patología Animal de nuestra Facultad.

En ausencia de un aislado viral, es imposible implementar técnicas de diagnóstico virológicas y serológicas que permitan conocer la magnitud de la infección en la especie canina en nuestro medio, y por lo tanto, no se pueden establecer medidas de control para la infección. Esto motivó a realizar el aislamiento de una cepa nativa de este virus.

## MATERIAL Y METODOS

*Muestras:* Las muestras fueron obtenidas de caninos, cuyo caso clínico hizo sospechar de la presencia del VHC-1, por ejemplo: lesiones en mucosa genital y enfermedad respiratoria en el adulto, cachorro con mortalidad neonatal y feto abortado. En el animal vivo se tomaron muestras mediante tómulas estériles y en animal muerto se tomaron muestras de órganos.

*Inóculo:* Los exudados o líquidos de vesículas tomadas con tómulas se agitaron en un "vortex" para desprender partículas virales desde algodón, ayudándose de una solución salina adicionada de antibióticos penicilina (100UI/ml) y estreptomycinina (100 µg/ml). El sobrenadante resultante constituyó el inóculo. En el caso de tejidos como trozos de órganos, éstos se cortaron

con tijeras y luego se trituraron con una sustancia abrasiva (arena). Posteriormente se diluyeron en solución salina y se centrifugaron a 1500xg durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación constituyó el inóculo viral.

*Cultivos celulares:* Se prepararon cultivos celulares primarios (CCP) a partir de riñón y pulmón canino. Las células se obtuvieron por digestión enzimática, utilizando tripsina al 0.25% en solución salina y luego se cultivaron a 37° C en medio esencial mínimo de Eagle (MEM), adicionado con antibióticos (penicilina (100U/ml), estreptomycinina (100 µg/ml)) y suplementado con 10% de suero fetal bovino. Además se utilizó la línea celular MDCK (Madin-Darby canine kidney), proveniente de riñón canino.

*Aislamiento viral:* Cada inóculo se sembró en un volumen de 200 µl en monocapas de cultivos celulares de pulmón y riñón canino de 24 horas, incubando durante una hora a 32-33° C. Luego se retiró el sobrenadante y se reconstituyó el volumen original. Posteriormente se incubó a la misma temperatura descrita con observación diaria durante 5 a 7 días. Se realizaron 5 pasajes seriados antes de descartar el inóculo por considerarlo negativo.

Se consideró como muestra negativa todo aquel inóculo que en un proceso de 5 pasajes seriados no manifestara efecto citopático (ECP) en las monocapas de células, y como muestra positiva a todo aquel inóculo que manifestara ECP en ausencia del uso de solventes orgánicos.

*Prueba de inmunofluorescencia directa:* Se procedió a cultivar células en tubos Leighton. Brevemente, las laminillas con monocapas fueron infectadas con el aislado RP5. Confirmada la aparición del efecto citopático se procedió a fijar las células mediante el uso de acetona fría por 5 minutos y luego a enfrentar estas células con un anticuerpo monoclonal marcado con isotiocianato de fluoresceína y dirigido contra VHC-1 (VMRD, Inc. USA). Se incubó en cámara húmeda por 30 minutos a

37°C, luego se retiró el exceso de reactivo mediante lavados con PBS. Finalmente, para verificar reacción positiva y negativa (cultivos sin infectar), se utilizó un microscopio de fluorescencia Nikon con aumento de 1000X.

## RESULTADOS Y DISCUSION

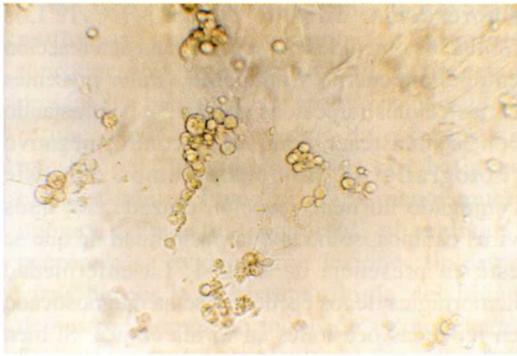
De un total de 20 muestras obtenidas tanto de órganos de cachorros sospechosos como también de muestras de adultos, se logró obtener un aislado procedente de un riñón canino (RP5), que provoca EC en cultivos primarios de riñón y pulmón canino, efecto que aparece a partir del tercer pasaje (figura 1). Este resultado preliminar sugiere la presencia de un virus perteneciente a la familia *Hesperiviridae*, agente capaz de provocar *in vitro* un ECP caracterizado por lisis celular. No obstante, los virus herpes no son los únicos que poseen esta característica. Dentro de los virus que afectan a cánidos y que producen un ECP similar se encuentra el virus de la hepatitis infecciosa canina (VAC-1), virus ADN de tamaño medio (75 nm) sin envoltura lipoproteica. Para dilucidar entre estos dos posibles virus, se preincubó el aislado RP5 en presencia de solventes lipídicos. La inoculación posterior en cultivos celulares no pudo reproducir el ECP, ya descrito, lo cual indicaría que la presencia de envoltura es fundamental para iniciar un ciclo infectivo, tal como está descrito para los virus de la familia *Hesperiviridae*.

Es sabido que los cultivos primarios tienen un  $\bar{n}$  mitótico definido y que, por lo tanto, la reproducibilidad de los resultados de una experiencia no es óptima. Bajo esta consideración, se realizaron en paralelo algunas experiencias que demostraron susceptibilidad y permisividad de la línea celular MDCK, frente a nuestro aislado RP5 (figura 2). Con este nuevo hallazgo y ante la imposibilidad de contar con un antisuero contra VHC-1 para realizar una prueba confirmatoria mediante un ensayo de seroneutralización, se optó por implementar una prueba de inmunofluorescencia directa, utilizando un anticuerpo monoclonal comercial (VMRD, Inc., USA), conjugado con isotiocianato de

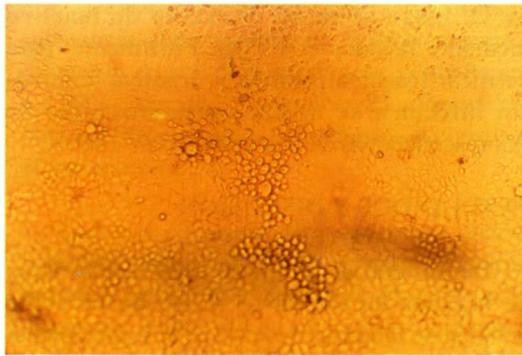
fluoresceína, dirigido contra VHC-1. Los resultados obtenidos demuestran una alta reacción entre el anticuerpo y antígenos virales presentes en las células infectadas (figura 3), contrastando con la nula reactividad en el control negativo (Fotografía 4). Si consideramos que este conjugado no tiene reacción cruzada con otros virus caninos, sólo cabe la posibilidad de que se esté en presencia de VHC-1. La enfermedad hemorrágica de los cachorros se ha diagnosticado en repetidas ocasiones en forma clínica. Si bien la descripción de los casos clínicos, el examen *post mortem* y la presencia de cuerpos de inclusión concuerdan plenamente con la literatura, sólo el aislamiento viral constituye una prueba confirmatoria y definitiva. El aislamiento informado constituye el punto de partida que permitirá comenzar la caracterización biológica y genómica del virus, por una parte, y la elaboración de un método diagnóstico, por otra.

## RESUMEN

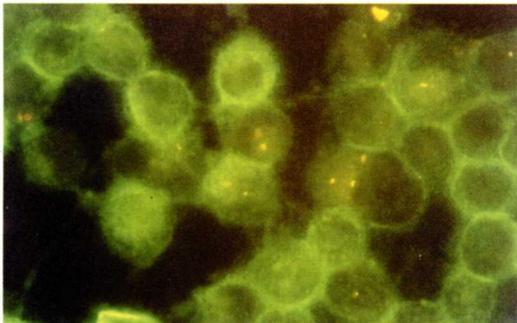
Este trabajo informa la detección del virus herpes canino tipo 1 (VHC-1) en nuestro país, confirmando la fuerte sospecha clínica de su existencia. Se logró obtener un aislado viral, denominado RP5, a partir de casos clínicos diagnosticados como enfermedad hemorrágica de los cachorros. Este aislado inoculado en monocapas celulares produce el típico efecto citopático de miembros de la subfamilia *alphaherpesvirinae*, familia *Herpesviridae*: lisis celular a tiempos cortos. Este aislado manifiesta este efecto tanto en cultivos primarios de pulmón y riñón canino, como también en la línea celular MDCK. Este efecto se pierde al preincubar el inóculo con solventes orgánicos, lo cual indica presencia de envoltura lipoproteica, lo cual descartaría la presencia de VAC-1 en este aislado. Como segunda confirmación de la presencia de VHC-1 en los cultivos celulares inoculados se procedió a realizar una prueba de inmunofluorescencia directa, utilizando un anticuerpo monoclonal anti VHC-1, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (VMRD, Inc.), cuyos resultados señalan inequívocamente la presencia del virus.



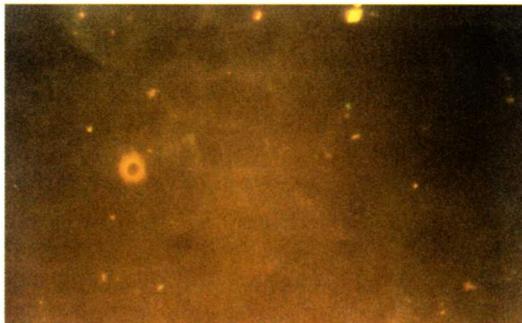
**FIGURA 1.** Efecto citopático provocado por aislado RP5 en cultivo primario de riñón canino. 100X.  
Cytopathic effect observed in canine kidney primary cell cultures infected with RP5 isolate. 100X.



**FIGURA 2.** Efecto citopático provocado por aislado RP5 en células de la línea MDCK.  
Cytopathic effect observed in MDCK cell line infected with RP5 isolate. 100X.



**FIGURA 3.** Inmunofluorescencia directa. Reacción positiva al infectar células de la línea MDCK con RP5. 1000X.  
Direct immunofluorescence. Positive reaction observed in MDCK cell line infected by RP5 isolate. 1000X.



**FIGURA 4.** Inmunofluorescencia directa. Reacción negativa. Células de la línea MDCK sin infectar con RP5. 1000X.  
Direct immunofluorescence. Negative reaction. MDCK cell line without infection by RP5 isolate. 1000X.

Determinar la presencia del virus es de gran importancia, pues al aislar y caracterizar el virus se podrá contar con un instrumento imprescindible para realizar futuras investigaciones. Por ejemplo, evaluar la magnitud de la infección en la especie canina, conocer de la repercusión de la infección por este virus en plantales reproductores, como también enfrentar el desafío del diseño de métodos diagnóstico de laboratorio mediante técnicas que involucran la inmunofluorescencia, el enzimoimmunoanálisis (ELISA) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y también elaborar

posibles estrategias mediante la utilización de una eventual vacuna.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Aldo Gaggero B., del Programa de Virología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, por habernos facilitado la línea celular MDCK, de gran importancia para la reproducibilidad de experiencias en cultivos celulares.

## BIBLIOGRAFIA

- BOEHMER, P., L. LEHMAN. 1997. Herpes simplex virus DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 347-384.
- BURR, P., M. CAMPBELL., L. NICOLSON., D. ONIONS. 1996. Detection of canine herpesvirus-1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 53: 227-237
- CARMICHAEL, L., J. STRANDBERG., F. BARNES. 1965. Identification of a cytopathogenic agent infectious for puppies as a canine herpes virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 120: 644-650.
- HUXTABLE, C., B. FARROW. 1970. Canine herpesvirus as a suspected cause of neonatal mortality in puppies. *Austr. Vet. J.* 46: 344-345
- LARENAS, J., M. SANTIBÁÑEZ, P. BERRÍOS. 1992. Primeros antecedentes en Chile de infección por herpes canino con mortalidad neonatal. *MEVEPA.* 1: 13-16.
- MANNING, A., A. BUCHAN., G. SKINNER., J. DURHAN., H. THOMPSON. 1988. The immunological relationship between canine herpesvirus and four other herpesvirus. *J. Gen. Virol.* 69: 1601-1608.
- RATUD, D. Y., G. WERNER. 1967. Le virus herpetique canin. *Ann. Inst. Pasteur.* 112: 802-807.
- READING, M., H. FIELD. 1998. A serological study of canine herpesvirus-1 infection in the English dog population. *Arch. Virol.* 143: 1477-1478.
- THOMPSON, H., N. WRIGHT., H. CORNWELL. 1972. Canine herpesvirus respiratory infection. *Res. Vet. Sci.* 13: 123-126.
- XUAN, X., T. HORIMOTO., M. ONO., J. LIMCUMPAO., Y. TOHYA., M. AZETAKA., E. TAKAHASHI., T. MIKAMI. 1990. Restriction endonuclease analysis of canine herpesviruses isolated in Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.* 52: 1181-1188.
- XUAN, X., K. MAEDA., Y. TOHYA., T. MIKAMI., A. OTSUKA. 1996. Identification and nucleotide sequence of the thymidine kinase gene of canine herpesvirus. *Virus Gene* 12: 185-188.