

Programa de Doctorado
en Sanidad Animal



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

INFECCIONES VÍRICAS ESPONTÁNEAS EN HURONES DOMÉSTICOS (*Mustela putorius furo*)

DAVID PERPIÑÁN



TESIS DOCTORAL • 2015 • LAS PALMAS DE GRAN CANARIA



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA



D^a. MARÍA SORAYA DÉNIZ SUÁREZ, SECRETARIA DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

CERTIFICA

Que el Consejo de Doctores del Instituto en su sesión de fecha 09 de febrero tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada: **“Infecciones víricas espontáneas en hurones domésticos (*Mustela putorius furo*)”** presentada por el doctorando David Perpiñán Hinarejos y dirigida por los doctores Antonio J. Fernández Rodríguez, Enrique Rodríguez Grau-Bassas y María Soraya Déniz Suárez.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a diez de febrero de dos mil quince.



Anexo II

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Departamento: IUSA - Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

Programa de Doctorado: **“SANIDAD ANIMAL”**

Título de la Tesis

“INFECCIONES VÍRICAS ESPONTÁNEAS EN HURONES DOMÉSTICOS (*Mustela putorius furo*)”.

Tesis Doctoral presentada por **D David Perpiñán Hinarejos**

Dirigida por los Dres. **Antonio J. Fernández Rodríguez, Enrique Rodríguez Grau-Bassas y María Soraya Déniz Suárez**

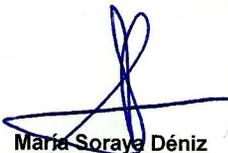
El Director,


Antonio Fernández

El Director,


Enrique Rodríguez

El Director,


María Soraya Déniz

El Doctorando,


David Perpiñán

Las Palmas de Gran Canaria, a 11 de febrero de 2015

**INFECCIONES VÍRICAS ESPONTÁNEAS EN
HURONES DOMÉSTICOS (*Mustela putorius furo*)**

por

DAVID PERPIÑÁN

Veterinario

Magíster en Medicina y Cirugía Animales

Diplomado por el Colegio Europeo de Medicina Zoológica (Herpetología)

Bajo la dirección de

Dr. Antonio J. Fernández Rodríguez (director)

Dr. Enrique Rodríguez Grau Bassas (codirector)

Dra. María Soraya Déniz Suárez (codirectora)

Las Palmas de Gran Canaria, Islas Canarias, España

2015

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Moquillo canino	3
2.2. Coronavirus	10
2.2.1. Enteritis catarral epizoótica	11
2.2.2. Enfermedad sistémica por coronavirus en hurones	13
2.2.3. Peritonitis infecciosa felina (PIF)	14
2.3. Enfermedad aleutiana	18
2.3.1. Enfermedad aleutiana en visones	19
2.3.2. Enfermedad aleutiana en hurones	23
2.3.3. Enfermedad aleutiana en otras especies	25
2.4. Referencias bibliográficas	27
3. OBJETIVOS	41
4. BROTE DE MOQUILLO CANINO EN HURONES DOMÉSTICOS	43
4.1. Introducción	43
4.2. Material y métodos	43
4.3. Resultados	46
4.4. Discusión	52
4.5. Referencias bibliográficas	57
5. DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD POR CORONAVIRUS SISTÉMICO EN HURONES	61
5.1. Introducción	61
5.2. Material y métodos	61
5.3. Resultados	64
5.4. Discusión	67

5.5. Referencias bibliográficas	72
6. IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENO DE CORONAVIRUS TIPO 1 EN LAS LESIONES HISTOLÓGICAS DE LA ENFERMEDAD SISTÉMICA POR CORONAVIRUS EN HURONES	75
6.1. Introducción	75
6.2. Material y métodos	75
6.3. Resultados	76
6.4. Discusión	82
6.5. Referencias bibliográficas	85
7. VALORACIÓN DE LESIONES, ANTICUERPOS Y ANTÍGENO DE ENFERMEDAD ALEUTIANA EN HURONES CLÍNICAMENTE SANOS	87
7.1. Introducción	87
7.2. Material y métodos	87
7.3. Resultados	89
7.4. Discusión	95
7.5. Referencias bibliográficas	98
8. CONCLUSIONES FINALES	101
9. AGRADECIMIENTOS	107

1. RESUMEN

El hurón doméstico (*Mustela putorius furo*) es una especie con importancia como mascota y como animal de experimentación. La susceptibilidad de los hurones a las enfermedades víricas es notable, y durante las últimas décadas esta especie se ha utilizado para investigar diferentes aspectos de algunas enfermedades de interés humano y veterinario, como la influenza, el moquillo o la enfermedad aleutiana. Se han realizado y publicado numerosos estudios experimentales sobre enfermedades víricas en hurones; sin embargo, poco se ha descrito sobre la ocurrencia espontánea de estas enfermedades. Esta tesis doctoral describe las características clínicas y patológicas observadas en hurones infectados de forma natural con el virus del moquillo canino (CDV), el coronavirus sistémico de los hurones (FSCV) y el virus de la enfermedad aleutiana (ADV). Las principales conclusiones de esta tesis se describen aquí: Primera, se describe un estudio original sobre un brote de moquillo que ocurrió en la ciudad de Barcelona. Segunda, se describe una nueva enfermedad en hurones causada por un coronavirus sistémico. Tercera, se presentan los hallazgos histológicos de hurones clínicamente sanos infectados por ADV. Esta tesis contribuye con información única no descrita anteriormente sobre la infección en hurones con CDV, FSCV y ADV. Todos estos hallazgos han sido publicados, o están en vías de publicación, en revistas de reconocido prestigio y debe tenerse en cuenta por investigadores y veterinarios que trabajen con hurones.

ABSTRACT

The domestic ferret (*Mustela putorius furo*) is an important household pet and research animal model. Susceptibility of ferrets to viral diseases is significant, and over the last decades this species has been used in research to study different aspects of some diseases of special interest for human and veterinary medicine, such as influenza, distemper and Aleutian disease. Multiple experimental studies have been done and published about viral diseases in ferrets; however, little has been reported about the spontaneous occurrence in nature. This doctoral thesis describes the infection, the clinical outcome and the macroscopic and microscopic lesions observed in ferrets naturally infected by canine distemper virus (CDV), ferret systemic coronavirus (FSCV) and Aleutian disease virus (ADV). Main conclusions are summarized here: First, an original clinical study of a distemper virus outbreak in ferrets that occurred in Barcelona is referenced. Second, a novel systemic disease in ferrets caused by a coronavirus is described. Third, new histological and immunohistological findings are presented in non-symptomatic ADV-persistently infected ferrets. This thesis contributes with new and previously not described clinical and pathological findings in ferrets naturally infected by CDV, FSCV or ADV. All these findings are or will be published in peer review scientific journals and should be taken into consideration by researchers and veterinarians working with ferrets.

2. INTRODUCCIÓN

El hurón doméstico (*Mustela putorius furo*) es una especie con importancia como animal de compañía (mascota) y de experimentación. Los hurones son muy susceptibles a las enfermedades víricas, particularmente al moquillo canino, y han sido utilizados como modelos experimentales para la influenza, el sarampión y el Síndrome Respiratorio Agudo Grave (*Severe Acute Respiratory Syndrome: SARS*) (Fox *et al.*, 1998; Kiupel y Perpiñán, 2014). La mayor parte de la información de estas enfermedades víricas se ha obtenido a partir de infecciones experimentales en hurones, pero son mucho más escasos los datos clínicos y patológicos en infecciones naturales espontáneas. La presente tesis tiene como objetivo general contribuir en este sentido al conocimiento de las infecciones víricas espontáneas en hurones (moquillo canino, enfermedad aleutiana y enfermedad por coronavirus sistémico del hurón).

2.1. Moquillo canino

El virus del moquillo canino (*Canine Distemper Virus: CDV*) pertenece al género *Morbillivirus* en la familia *Paramyxoviridae*; otros virus que también pertenecen a este género son el virus del sarampión, el virus de la peste bovina, el virus de la peste de los pequeños rumiantes, el virus del moquillo de las focas, el morbillivirus de los delfines, el morbillivirus de las marsopas, el morbillivirus equino y el morbillivirus porcino (Appel, 1987; Fox *et al.*, 1998; Greene y Appel, 2006). El CDV es relativamente grande, con un diámetro variable y ARN de una sola cadena (Greene y Appel, 2006). El CDV es susceptible a la luz ultravioleta, al calor y a la desecación; sin embargo, puede sobrevivir durante semanas a 0°C (Greene y Appel, 2006).

El CDV causa el moquillo canino (*Canine Distemper: CD*), una enfermedad sistémica contagiosa, aguda o semiaguda, que afecta a carnívoros terrestres de las familias *Canidae*, *Mustelidae* y *Procyonidae* (Appel, 1987; Fox *et al.*, 1998; Roscoe, 1993). Otras familias del orden *Carnivora* pueden sufrir CD con menor frecuencia, como *Felidae*, *Viverridae*, *Herpestidae*, *Ailuridae*, *Ursidae* y *Hyaenidae* (Appel, 1987; Appel y Summers, 1995; Greene y Appel, 2006; López-Peña *et al.*, 2001; RoelkeParker *et al.*, 1996). Además, la enfermedad causada por CDV se ha descrito en pangolines (orden *Pholidota*, familia *Manidae*), pécaris (orden *Artiodactyla*, familia *Tayassuidae*), macaco Rhesus (orden *Primates*, familia *Cercopithecidae*) y algunas especies de focas y leones marinos (orden *Pinnipedia*, familias *Phocidae* y *Otariidae*) (Appel *et al.*, 1991; Barrett *et al.*, 2004; Chin *et al.*, 2008; Greene y Appel, 2006; Sun *et al.*, 2010). El virus tiene un serotipo y diversas cepas; la gravedad de la enfermedad depende de la cepa y de factores intrínsecos al hospedador, como la especie y la inmunocompetencia (Fox *et al.*, 1998; Greene y Appel, 2006; Stanton *et al.*, 2003).

La transmisión del CDV se produce principalmente por aerosol o secreciones/exudados orales, respiratorios u oculares que contengan el virus (Williams, 2001). La transmisión por piel, heces u orina se considera menos importante; la transmisión transplacentaria se ha documentado en perros, pero no en hurones (Williams, 2001). Para la transmisión del CD se necesita una asociación cercana entre animales infectados y susceptibles, debido a la relativa fragilidad del CDV en el ambiente (Williams, 2001).

El periodo de incubación varía aproximadamente entre una semana a un mes o más (Williams, 2001). La duración del curso clínico también depende de muchos factores y varía de una a seis semanas, con recuperación o muerte (Williams, 2001). La excreción vírica ocurre también en la forma subclínica, y el virus se puede eliminar desde el día 7 post-infección (p.i.) hasta el día 90

p.i. (Williams, 2001); sin embargo, los periodos de eliminación más cortos son más frecuentes (Greene y Appel, 2006). El contacto entre animales recientemente infectados (con enfermedad subclínica o clínica) mantiene el virus en una población, y la presencia constante de cachorros contribuye a mantener una población susceptible a la infección (Greene y Appel, 2006).

En áreas endémicas con elevadas densidades de perros, la enfermedad clínica se observa frecuentemente en cachorros tras la pérdida de la inmunidad materna, a los 3-6 meses de edad. En poblaciones aisladas de perros, el moquillo es epidémico y los brotes pueden ser graves, diseminados y afectar a todas las edades (Greene y Appel, 2006; Williams, 2001).

La inmunidad obtenida por las cepas virulentas de CDV es prolongada y podría durar de por vida, aunque la vacunación no es capaz de llegar a este nivel de protección (Greene y Appel, 2006). Sin embargo, la inmunidad en animales que han superado la infección puede comprometerse si se exponen a una cepa altamente virulenta o a una alta cantidad de virus, o en casos de situaciones con compromiso inmunológico o estrés (Greene y Appel, 2006). Se estima que entre el 25 y el 75% de los perros susceptibles se infectan de forma subclínica y eliminan el virus de su organismo sin mostrar signos de enfermedad (Greene y Appel, 2006).

Los signos clínicos de la enfermedad dependen de la especie, la cepa de virus, la inmunocompetencia del hospedador, etc. Generalmente, es una enfermedad sistémica que afecta principalmente a la piel, al sistema respiratorio y al sistema nervioso central (Greene y Appel, 2006). Los signos clínicos incluyen depresión, exudado nasal mucopurulento, tos, fiebre, anorexia, vómito, diarrea, comportamientos anormales, convulsiones, signos vestibulares y cerebelares, hiperqueratosis de la piel (almohadillas plantares, párpados, labios, ano) y prurito (Williams, 2001). Los cambios en los valores hematológicos y bioquímicos son inespecíficos, aunque es frecuente observar linfopenia (Greene y Appel, 2006; Williams, 2001).

El diagnóstico se realiza generalmente en base a la historia clínica, los signos clínicos y una prueba de fluorescencia a los anticuerpos realizada sobre frotis de secreciones conjuntivales o respiratorias (Greene y Appel, 2006; Williams, 2001). Otras técnicas diagnósticas, como la inmunohistoquímica, la PCR, la medición de anticuerpos sanguíneos o el aislamiento vírico son igualmente válidas, aunque no se utilizan con tanta frecuencia (Greene y Appel, 2006; Williams, 2001). La necropsia puede mostrar atrofia del timo en animales jóvenes, neumonía intersticial y lesiones relacionadas con los signos clínicos (Greene y Appel, 2006). Los cambios histológicos más representativos son neumonía (desde neumonía intersticial hasta bronconeumonía supurativa), depleción linfoide, meningoencefalitis, degeneración neuronal y desmielinización (Greene y Appel, 2006; Williams, 2001). Los cuerpos de inclusión intracitoplásmicos y/o intranucleares se pueden observar en células epiteliales, neuronas y células de glía (Greene y Appel, 2006; Williams, 2001).

Entre las especies susceptibles al moquillo, el hurón es de las que presenta una mortalidad más alta (cerca del 100%) (Williams, 2001). En esta especie, a los dos días tras la infección experimental ya se puede detectar el virus en sangre, mucosa nasal, pulmón, bazo y linfonodos cervicales (Fox *et al.*, 1998). La viremia persiste hasta que el hurón muere o el virus es neutralizado por los anticuerpos (Fox *et al.*, 1998). El CDV tiene efectos inmunosupresores ya que produce depleción linfoide y linfopenia (Fox *et al.*, 1998; Greene y Appel, 2006). La infección transplacentaria no se ha demostrado en hurones (Fox *et al.*, 1998).

Existen muchos estudios experimentales de moquillo canino en hurones. Estos trabajos demuestran periodos de incubación de 4-10 días, con una alta mortalidad, que ocurre a los 5-28 días después del inicio de los signos clínicos. Los animales afectados generalmente desarrollan una enfermedad sistémica con signos respiratorios, dermatológicos y neurológicos. Los primeros

signos son anorexia, pirexia, fotofobia y secreción nasal serosa. En la zona de la barbilla aparece una lesión eritematosa y prurítica que luego se extiende también a la zona inguinal. El exudado oculonasal seroso evoluciona a mucopurulento y termina formando costras en los labios, la nariz, la barbilla y los ojos; los párpados generalmente se quedan cerrados y no se pueden abrir. La hiperqueratosis de las almohadillas plantares es una lesión que no se observa en todos los casos. Las infecciones respiratorias bacterianas secundarias también han sido descritas como parte del proceso de enfermedad en el que el hurón puede morir o vivir lo suficiente para desarrollar signos neurológicos (Crook *et al.*, 1958; Davidson, 1986; Evermann *et al.*, 2001; Fox *et al.*, 1998; Gill *et al.*, 1988; Gorham, 1999; Jones *et al.*, 1997; Kauffman *et al.*, 1982; Kilham *et al.*, 1956; Rosenthal, 2004; Shen y Gorham, 1978; Stanton *et al.*, 2003; Stephensen *et al.*, 1997; von Messling *et al.*, 2003; Wimsatt *et al.*, 2001). La enfermedad tiene una prevalencia baja en aquellos países que vacunan de forma adecuada (Blair *et al.*, 1998; Fox *et al.*, 1998).

La mortalidad en hurones con signos clínicos de moquillo e infectados con cepas de alta patogenicidad se aproxima al 100% según la bibliografía (Fox *et al.*, 1998; Rosenthal, 2004), si bien la infección con cepas menos patogénicas produce una mortalidad significativamente menor (Kauffman *et al.*, 1982). Además de la cepa, factores como la edad, el estado inmunológico del hurón, la dosis infectiva y la vía de infección condicionan el resultado final de la enfermedad.

El tratamiento debe considerarse en cualquier hurón con moquillo, aunque es improbable que los casos graves o aquellos con signos neurológicos respondan al tratamiento (Evermann *et al.*, 2001). La terapia debe incluir siempre antibióticos de amplio espectro, pues las infecciones secundarias son frecuentes (por ejemplo, las bronconeumonías) (Fox *et al.*, 1998; Rosenthal, 2004). Es recomendable seleccionar el tratamiento antimicrobiano en base a cultivo y antibiograma de muestras obtenidas por lavado traqueal. Simultáneamente, se ha recomendado

la administración de vitamina A a dosis de 50.000 UI (15 mg) de palmitato de retinol IM SID en dos tratamientos, ya que un estudio demostró que reduce la mortalidad en hurones con moquillo canino (Rodeheffer *et al.*, 2007). Hay que indicar que este trabajo se realizó en hurones con una hipovitaminosis A inducida, lo que puede no ser el caso en infecciones espontáneas; la administración de dos dosis de vitamina A también ha resultado eficaz para reducir la mortalidad en personas con sarampión (Sudfeld *et al.*, 2010).

Hace décadas se sugirió que altas dosis de vitamina C eran muy eficaces para el tratamiento del moquillo en perros (Belfield, 1967). En ese artículo, todos los perros afectados por moquillo (12 animales) fueron tratados con vitamina C (a dosis de 1 g IV SID por 3 tratamientos) y todos se recuperaron de la enfermedad (Belfield, 1967). Aunque los resultados de este artículo son difíciles de aceptar actualmente, se puede intentar un tratamiento con vitamina C (reduciendo las dosis de forma adecuada para hurones), pues es poco probable la toxicidad por este tratamiento. El suero hiperinmune contra el moquillo canino también puede ser útil (Lewington, 2007), pero su disponibilidad comercial es muy escasa. El soporte nutricional (con dietas fácilmente digeribles, aminoácidos y electrolitos) es importante en los casos clínicos, pues los hurones con moquillo pierden el apetito y desarrollan un pobre estado nutricional, lo que reduce la función inmunitaria y no les permite luchar adecuadamente contra la enfermedad. Mantener hidratados a los hurones es de vital importancia (Davidson, 1986). Otros tratamientos sintomáticos con antiinflamatorios o broncodilatadores pueden estar indicados en algunos casos. Es obligatorio el aislamiento de los hurones afectados (Fox *et al.*, 1998).

La vacunación se puede utilizar como tratamiento ante un brote de moquillo, pero es necesaria la aplicación temprana de una gran cantidad de virus vacunal para lograr este efecto terapéutico (Burger y Gorham, 1964). El tiempo requerido para el desarrollo de este efecto es inversamente

proporcional a la dosis de virus vacunal, y a medida que pasa más tiempo entre la infección y la vacunación, se necesitan dosis más altas de virus vacunal y el índice de supervivencia es menor (Burger y Gorham, 1964). La vacunación no suele ser eficaz si han transcurrido más de 48 horas entre la infección y la vacunación, o en el caso de que la cantidad de virus infectivo sea muy alta o la cantidad de virus vacunal demasiado baja (Burger y Gorham, 1964); sin embargo, la vacunación en estas situaciones puede retrasar el inicio de los signos clínicos y prolongar el curso de la enfermedad (Burger y Gorham, 1964). De todos estos datos se deriva que la vacunación no es eficaz una vez que el hurón ha empezado a mostrar signos clínicos.

La vacunación contra el CDV ha sido muy eficaz en hurones y ha producido una disminución de los casos clínicos de esta enfermedad en muchos países. Las vacunas inactivadas inducen una protección menor que las vacunas atenuadas (Pavlacik *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 1996) y por lo tanto no se suelen utilizar. Las vacunas vivas modificadas que se han originado a partir de perros o visones pueden producir enfermedad en hurones (Davidson, 1986; Gill *et al.*, 1988) y por lo tanto tampoco se utilizan. Las vacunas vivas modificadas de origen aviar se consideran seguras y eficaces en hurones y otras especies (Appel, 1987; Appel y Summers, 1995; Williams *et al.*, 1996). Muchas de estas vacunas usan la cepa Onderstepoort. Las vacunas multivalentes caninas (con CDV vivo modificado de origen aviar) se han usado de forma segura en hurones, tanto la dosis completa como una quinta parte de la dosis completa (Fox *et al.*, 1998; Lewington, 2007). También existe una vacuna recombinante que contiene solo una pequeña porción del material genético del virus, lo que evita el desarrollo de la enfermedad; esta vacuna usa un poxvirus atenuado de canario como vector del material genético del CDV. La seguridad y eficacia de estas vacunas se ha demostrado en hurones y otras especies de carnívoros exóticos (Wimsatt *et al.*, 2003).

El CDV es susceptible a la luz ultravioleta, al calor y a la desecación (Greene y Appel, 2006), pero puede sobrevivir en tejidos infectados durante días a 25°C, semanas a 2-4°C y años a -70°C (Fox *et al.*, 1998; Greene y Appel, 2006). El virus puede sobrevivir en un rango de pH de 4,5 a 9,0 (Fox *et al.*, 1998). Los agentes químicos desinfectantes más comunes suelen eliminar el virus, como los compuestos de amonio cuaternario, el fenol al 0,75%, el hidróxido de sodio al 2-5% y el formol al 0,1% (Fox *et al.*, 1998). El Virkon-S (un desinfectante a base de peróxidos) también es eficaz contra el CDV de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Los fómites (como por ejemplo los guantes de manejo) también pueden transmitir el virus y por tanto deben desinfectarse adecuadamente (Fox *et al.*, 1998).

2.2. Coronavirus

Los coronavirus (género *Coronavirus*, familia *Coronaviridae*, orden *Nidovirales*) son virus comparativamente grandes, encapsulados y con una única cadena positiva de ARN (Addie y Jarrett, 2006; Wise *et al.*, 2006). Los coronavirus se dividen en tres grupos (I, II y III), aunque no está claro si el coronavirus del SARS (SARS-CoV) pertenece al segundo grupo o si forma uno diferente (IV) (Addie y Jarrett, 2006). Entre los coronavirus del grupo I están el coronavirus felino (*Feline Coronavirus: FCoV*), el virus de la gastroenteritis transmisible, el virus de la diarrea epidémica porcina, el coronavirus canino (*Canine Coronavirus: CCV*), el coronavirus de la bronquitis humana serotipo 229E y los coronavirus del hurón (Addie y Jarrett, 2006; Wise *et al.*, 2010; Wise *et al.*, 2006). Los coronavirus del grupo II incluyen el coronavirus humano cepa OC43, el virus de la hepatitis de los roedores, el coronavirus de la rata, el coronavirus bovino, el virus de la encefalomielitis hemaglutinante porcina y el coronavirus equino (Wise *et al.*, 2006). Los coronavirus aviares (virus de la bronquitis infecciosa de los pollos, coronavirus del pavo y coronavirus del faisán) pertenecen al grupo III (Wise *et al.*, 2006).

Los hurones pueden infectarse de forma espontánea por dos coronavirus diferentes, aunque emparentados: el coronavirus entérico de los hurones (*Ferret Enteric Coronavirus: FECV*) y el coronavirus sistémico de los hurones (*Ferret Systemic Coronavirus: FSCV*) (Wise *et al.*, 2010). Además, los hurones han sido infectados experimentalmente con SARS-CoV y han desarrollado una enfermedad similar a la desarrollada por humanos (Van den Brand *et al.*, 2008).

2.2.1. Enteritis catarral epizoótica

El FECV produce una enfermedad gastrointestinal en hurones denominada enteritis catarral epizoótica (*Epizootic Catarrhal Enteritis: ECE*) (Williams *et al.*, 2000; Wise *et al.*, 2006). Esta enfermedad se observó por primera vez en Estados Unidos en 1993, y la primera y única publicación original sobre sus características clinicopatológicas se publicó en el año 2000 (Williams *et al.*, 2000). El virus se transmite fácilmente en situaciones de superpoblación y la enfermedad se caracteriza por diarrea y deshidratación graves, con alta morbilidad y baja mortalidad. El periodo de incubación es de 48-72 horas. Los signos clínicos iniciales consisten en letargo, inapetencia y vómito, seguidos de una diarrea de color verde intenso con alto contenido en moco. Los hurones viejos muestran signos clínicos más graves que los jóvenes, y se cree que éstos pueden ser portadores asintomáticos. La edad media de los animales afectados por esta enfermedad es de cuatro años (Williams *et al.*, 2000).

La ECE comparte muchas similitudes con la gastroenteritis catarral epizoótica del visón, una enfermedad también producida por un coronavirus (Gorham *et al.*, 1990; Have *et al.*, 1992). Las lesiones microscópicas de la ECE en hurones incluyen degeneración vacuolar y necrosis de los enterocitos de las vellosidades intestinales, que además muestran atrofia y fusión de las mismas asociadas a un infiltrado linfoplasmocitario (enteritis linfoplasmocitaria) (Williams *et al.*, 2000).

Estas lesiones son más frecuentes en el yeyuno y también se asocian a un aumento del tamaño de los linfonodos regionales (Williams *et al.*, 2000).

Las partículas víricas se pueden encontrar en el citoplasma de los enterocitos de la zona apical de las vellosidades del yeyuno y, más raramente, en el intestino grueso (Williams *et al.*, 2000). Se puede realizar el diagnóstico mediante biopsia intestinal y detección antigénica por inmunohistoquímica; mediante detección de partículas virales por microscopía electrónica (Williams *et al.*, 2000); y/o, más recientemente, mediante técnicas de detección molecular por PCR en heces y saliva (Williams *et al.*, 2000).

La enfermedad se resuelve generalmente en el plazo de 5-7 días en hurones jóvenes, aunque puede mantener secuelas de maldigestión y/o malabsorción de duración variable (Williams *et al.*, 2000). Algunos hurones adultos desarrollan una diarrea intermitente y persistente por malabsorción (Hoefler, 2004).

El tratamiento empírico se basa en la administración de antibióticos de amplio espectro, fluidoterapia agresiva y cuidados de soporte (Hoefler, 2004; Williams *et al.*, 2000). El tratamiento con esteroides (prednisona 1 mg/kg BID × 14 d) y la introducción de una dieta de fácil absorción puede acelerar la recuperación (Hoefler, 2004; Williams *et al.*, 2000). El metronidazol tiene propiedades antiinflamatorias y antibióticas y puede mejorar la consistencia de las heces (20 mg/kg PO BID) (Lewington, 2007). El metronidazol no es muy apetecible para los hurones y puede comprometer la colaboración del propietario en el tratamiento.

La ECE es una enfermedad muy contagiosa y fácilmente transmisible (Lewington, 2007; Williams *et al.*, 2000), y la prevención se basa en evitar la exposición al virus. Los hurones afectados deben ser aislados de los animales asintomáticos o no expuestos (Hoefler, 2004). La

infección puede producirse por contacto con hurones infectados, así como con heces y fómites (Lewington, 2007). La contaminación fecal se puede reducir mediante limpieza exhaustiva de las jaulas, las camas y los recipientes de comida y bebida (Murray *et al.*, 2010). Se debe recordar que los hurones pueden ser portadores del virus durante mucho tiempo después de la resolución de los signos clínicos y se mantienen portadores y eliminadores durante periodos que pueden superar los seis meses (Lewington, 2007). Los coronavirus persisten en el ambiente durante periodos prolongados de tiempo bajo condiciones apropiadas (Lewington, 2007), si bien se pueden inactivar fácilmente con la mayoría de desinfectantes (Rabenau *et al.*, 2005).

La gravedad de la enfermedad se ha reducido mucho en los últimos años en comparación con la situación descrita en la década de los 90 (Lewington, 2007; Murray *et al.*, 2010), y actualmente es frecuente detectar animales positivos sin signos clínicos (Murray *et al.*, 2010; Provacía *et al.*, 2011).

2.2.2. Enfermedad sistémica por coronavirus en hurones

En el año 2006 se describió por primera vez en hurones una enfermedad con lesiones histológicas muy similares a la Peritonitis Infecciosa Felina (PIF) (Martínez *et al.*, 2006). En estas lesiones se detectó antígeno de un coronavirus del grupo I mediante inmunohistoquímica (Martínez *et al.*, 2006). Esta enfermedad se tratará con más detalle en los capítulos 5 y 6. Sin embargo, para comprender mejor la enfermedad sistémica por coronavirus en hurones (*Ferret Systemic Coronaviral Disease: FSCVD*), incluiremos en este apartado una breve revisión de la PIF.

2.2.3. Peritonitis infecciosa felina (PIF)

La PIF está causada por el FCoV. Están descritos dos tipos de FCoV (I y II); el tipo I es exclusivamente felino, mientras que el tipo II ha surgido de la recombinación del FCoV tipo I y el CCV (Vennema *et al.*, 1995). Ambos tipos son capaces de producir infección en gatos y de producir cuadros tanto asintomáticos como clínicos. Algunas cepas de FCoV son capaces de inducir PIF cuando se administran de forma intraperitoneal en gatos, pero otras cepas son incapaces de inducir enfermedad por esta vía, lo que probablemente se debe a diferente tropismo celular (Addie y Jarrett, 2006).

Actualmente se cree que todas las infecciones espontáneas por FCoV tienen capacidad para desarrollar PIF, aunque solamente un 10% de los gatos infectados enferman. Las cepas entéricas tienen como célula blanco a los enterocitos, donde se replican y causan diarrea o infecciones asintomáticas, mientras que las cepas con tropismo sistémico se replican en macrófagos y producen infección generalizada, con sintomatología propia de PIF. Una teoría sostiene que para que la PIF ocurra se debe producir una mutación de la cepa entérica del virus que permitiría su posterior replicación en macrófagos, pero esto está todavía por confirmar (Vennema *et al.*, 1998; Addie y Jarrett, 2006).

Los gatos se infectan con FCoV por vía digestiva y, posiblemente, por inhalación del virus. Se cree que el FCoV tipo II se replica en células del intestino delgado y que el tipo I lo hace en el íleon y el colon (Herrewegh *et al.*, 1997). En estos casos el virus se excreta con las heces a partir del segundo día tras la infección. En algunas infecciones, el FCoV puede replicarse en tonsilas y orofaringe, y puede excretarse por saliva durante algunas horas o días (Stoddart *et al.*, 1988).

La PIF es una enfermedad en la que participan mecanismos patogénicos inmunológicos (inmunomediada) que implican la participación de un virus o su/s antígeno/s, los anticuerpos antivirales producidos por el organismo y el complemento. Los gatos que no muestran anticuerpos antivirales ni activan el complemento contra FCoV no desarrollan PIF. Sin embargo, desde el punto de vista clínico-patológico, la PIF es una enfermedad inmunomediada atípica, ya que las articulaciones y la piel no se suelen afectar (Addie y Jarrett, 2006).

Los inmunocomplejos (antígeno viral y anticuerpos) dañan el endotelio de los vasos sanguíneos y activan una reacción de hipersensibilidad tipo III, lo que induce la producción de exudados y la consecuente denominación de PIF húmeda. Estos inmunocomplejos facilitan que el virus entre en otros tejidos y produzca una reacción inflamatoria de tipo piogranulomatoso, lo que le confiere la denominación de PIF seca. Los signos clínicos de la PIF son una consecuencia directa de lesiones vasculares (vasculitis) y piogranulomatosas en diferentes órganos (Addie y Jarrett, 2006).

La PIF húmeda constituye la forma aguda de la enfermedad y ocurre 4-8 semanas tras la infección y/o tras un episodio de estrés, aunque puede aparecer también como forma terminal en casos de PIF seca. La PIF seca, que es la forma crónica de la enfermedad, ocurre semanas o meses después de la infección y puede ser el resultado de una respuesta inmunitaria celular exagerada por parte del hospedador. La seroconversión ocurre entre 18 y 21 días después de la infección (Pedersen, 1995; Addie y Jarrett, 2006).

Muchos de los gatos que seroconvierten tras una infección espontánea no desarrollan PIF y tienen menos probabilidades de desarrollar la enfermedad ante una nueva exposición al virus. Los gatos infectados pueden eliminar virus durante meses, y algunos de ellos se vuelven

portadores de por vida. Adicionalmente, algunos gatos pueden eliminar la infección. Los gatos seronegativos no excretan FCoV, mientras que aproximadamente un 30% de los seropositivos sí lo hacen. La excreción generalmente se detiene tras unos meses y sólo algunos animales infectados desarrollan PIF (Addie y Jarret, 1992; Addie y Jarrett, 2006).

La mayoría de infecciones por FCoV son subclínicas y pueden mostrar inicialmente episodios breves de sintomatología respiratoria o digestiva leves (Addie y Jarrett, 1992). Los gatos de cualquier edad pueden desarrollar PIF, pero aproximadamente el 50% de los gatos con PIF tienen menos de dos años de edad (Harvey *et al.*, 1996). La sobrepoblación de gatos facilita la infección con FCoV y el desarrollo de PIF. Los gatos con PIF húmeda muestran palidez o ictericia de las mucosas, ascitis, efusión torácica, anorexia, ligera pirexia, pérdida de peso, disnea, taquipnea, aumento del tamaño escrotal, efusión pericárdica y/o linfadenopatía mesentérica. Los signos clínicos de la PIF seca son más inespecíficos e incluyen pirexia leve, pérdida de peso, somnolencia, pérdida de apetito, disnea, iriditis, signos neurológicos y palpación abdominal anormal (linfadenopatía mesentérica, riñones irregulares y/o irregularidades nodulares en otros órganos) (Addie y Jarrett, 2006). La PIF también se puede desarrollar en félidos no domésticos (Addie y Jarrett, 2006; Evermann *et al.*, 1988; Juan-Sallés *et al.*, 1998).

Los cambios hematológicos típicos de ambas formas de PIF son linfopenia y neutrofilia con desviación a la izquierda. La hipergammaglobulinemia policlonal (gammaglobulinas > 3,5 g/dL) es un hallazgo característico en la PIF, tanto en el suero como en las efusiones. Se puede observar anemia no regenerativa en casos de PIF seca. Otras alteraciones bioquímicas reflejan el daño en órganos con lesiones de PIF (Addie y Jarrett, 2006).

El diagnóstico de la infección vírica se puede realizar mediante PCR de contenidos fecales o biopsias, o mediante histopatología de biopsias de órganos. Existen algoritmos para diagnosticar PIF basados en signos clínicos, factores ambientales y hallazgos laboratoriales. Otras pruebas laboratoriales, como la serología, no son tan fiables ya que un título de anticuerpos positivo no necesariamente significa que el animal esté enfermo de PIF. La inmunofluorescencia y la inmunohistoquímica también son válidas para la detección del virus o sus antígenos en efusiones, citologías y/o biopsias (Addie y Jarrett, 2006).

La lesión característica de la PIF es la inflamación piogranulomatosa. En la PIF húmeda se puede observar macroscópicamente que todas las serosas abdominales y/o torácicas pueden estar recubiertas por pequeñas placas blanquecinas. En la PIF seca, las lesiones macroscópicas pueden ser mucho más variables, pero los riñones casi siempre están afectados. En algunos gatos las anomalías macroscópicas son mínimas, y el diagnóstico lesional solo se puede comprobar mediante un examen histológico que demuestre vasculitis. Esta vasculitis suele afectar a una arteriola o a una vénula y se caracteriza por un área central de necrosis asociada a un infiltrado de células mononucleares, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y neutrófilos (Addie y Jarrett, 2006).

Existen diferentes fármacos para el tratamiento de la PIF, aunque ningún antiviral actúa frente a FCoV; sin embargo, se están desarrollando fármacos contra los coronavirus que afectan a humanos, como el SARS. Debido a que la PIF es una enfermedad inmunomediada, el tratamiento se dirige a controlar la respuesta inmune frente al FCoV, de ahí que la mejor terapia consista en altas dosis de fármacos inmunosupresores, antiinflamatorios e interferón- ω (Pedersen 1995; Addie y Jarrett 2006).

La prednisolona (2-4 mg/kg/día PO, con una reducción gradual de la dosis cada 2 semanas hasta encontrar la dosis óptima de respuesta) ayuda a una mejoría clínica, estimula el apetito y suprime la respuesta inmunitaria humoral y celular (Addie y Jarrett 2006). El interferon- ω felino se ha usado con cierto éxito combinado con glucocorticoides. La dosis es de 10^6 unidades/kg SC en días alternos seguido de dosis semanales, o bien 50.000 unidades por gato PO durante un periodo variable hasta la remisión clínica (Ishida *et al.*, 2004). La vacunación ha sido poco eficaz en la prevención de la enfermedad e incluso puede inducir la enfermedad con un cuadro más grave que la infección natural (Addie y Jarrett, 2006).

2.3. Enfermedad aleutiana

La enfermedad aleutiana (*Aleutian Disease: AD*) es una enfermedad crónica y progresiva causada por un parvovirus (*Aleutian Disease Virus: ADV*) (Fox *et al.*, 1998). El ADV pertenece a la familia *Parvoviridae*, subfamilia *Parvovirinae* y género *Amdovirus* (Jahns *et al.*, 2010). Los parvovirus son virus ADN pequeños y no encapsulados (McCaw y Hoskins, 2006). El ADV es el único miembro del género *Amdovirus* (Cheng *et al.*, 2010). La patogenicidad de las diferentes cepas de ADV depende de la especie a la que infecte (Allender *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2010). Al igual que otros parvovirus, el ADV puede producir infecciones latentes (Best y Bloom, 2005; Cheng *et al.*, 2010). Los parvovirus son extremadamente estables y resistentes a la mayoría de detergentes y desinfectantes, aunque son susceptibles al hipoclorito de sodio (lejía) (McCaw y Hoskins, 2006). Los parvovirus persisten en el ambiente durante largos periodos de tiempo (Jackson *et al.*, 1996a).

La AD fue observada por primera vez en la década de los años 40 produciendo una enfermedad crónica y progresiva en visones americanos de granja (*Mustela vison*) que poseían el gen

recesivo autosómico (aa) de la capa de pelo aleutiana (Hartsough y Gorham, 1956). Este gen es el responsable del pelaje azulado que confiere un alto valor económico a las pieles de estos animales (Fox *et al.*, 1998; Stevenson *et al.*, 2001). Durante el siglo XX la industria peletera sufrió importantes pérdidas económicas debido a esta enfermedad. Antes de la identificación del ADV, el moquillo y el botulismo eran las principales enfermedades que preocupaban a los criadores de visones (Stevenson *et al.*, 2001).

Estos criadores fabricaban autovacunas frente al moquillo homogenizando bazos de visones infectados (Stevenson *et al.*, 2001). Se sospecha que esta práctica fue responsable de brotes de AD en muchas granjas, con una mortalidad elevada en visones (Stevenson *et al.*, 2001). La AD se describió en hurones en la década de los años 60 (Fox *et al.*, 1998).

La AD se caracteriza histológicamente por una hiperreactividad del sistema linfoide, con infiltrados linfoplasmocitarios en múltiples órganos (Daoust y Hunter, 1978). Tras la infección con ADV, los anticuerpos antivirales (Ig G) se unen al virus y forman inmunocomplejos (Best y Bloom, 2005; Daoust y Hunter, 1978). Estos agregados de proteínas se depositan en los tejidos y provocan una serie de fenómenos inmunomediados, lo que genera las lesiones y los signos clínicos (Best y Bloom, 2005; Daoust y Hunter, 1978). Esta actividad inmunitaria también produce una hipergammaglobulinemia (gammaglobulinas > 20% de las proteínas totales) característica de los animales infectados (Fox *et al.*, 1998).

2.3.1. Enfermedad aleutiana en visones

Como en otras enfermedades víricas, las manifestaciones clínicas de AD dependen de la cepa de virus y de factores propios del hospedador, como su genotipo y su estado inmunitario (Jackson *et al.*, 1996b; Stevenson *et al.*, 2001). Mientras que algunas cepas producen una enfermedad grave

en visones, otras infecciones son asintomáticas (Cheng *et al.*, 2010). En visones, la cepa Utah-1 produce una enfermedad grave, pero en cambio la cepa de hurón produce lesiones leves sin hipergammaglobulinemia, lo que la clasifica como no patogénica, al igual que la cepa ADV-G (Cheng *et al.*, 2010; Porter *et al.*, 1982).

La infección en recién nacidos produce una enfermedad aguda con replicación viral en el pulmón, lo que causa una neumonía intersticial fulminante (Best y Bloom, 2005). En esta forma de enfermedad aguda en recién nacidos, los anticuerpos tienen un papel protector contra la enfermedad, por lo que el término AD no adecuado para definir estos casos (Best y Bloom, 2005).

Las crías que sobreviven a la infección aguda pueden desarrollar la forma crónica y debilitante de la enfermedad cuando son adultos (Jackson *et al.*, 1996a), con replicación viral en linfonodos (Best y Bloom, 2005) y signos clínicos como pérdida de peso, mal pelaje, letargo, anorexia, polidipsia, anemia y melena (Stevenson *et al.*, 2001). También se pueden observar problemas reproductivos como infertilidad, camadas pequeñas y un alto índice de nacimientos prematuros (Jahns *et al.*, 2010; Stevenson *et al.*, 2001).

Los hallazgos de necropsia incluyen riñones pequeños, esplenomegalia, linfadenopatía mesentérica, hepatomegalia y sangre en el tracto intestinal (Stevenson *et al.*, 2001). El hallazgo laboratorial más característico es la hipergammaglobulinemia (Best y Bloom, 2005). La hipergammaglobulinemia observada en la mayoría de visones con AD se caracteriza como policlonal; sin embargo, en algunos visones infectados de forma crónica se detecta una transformación hacia monoclonal (Kenyon *et al.*, 1967).

La producción de anticuerpos antivirales exagera la enfermedad y causa la sintomatología y la patología típicas de la forma crónica de AD (Best y Bloom, 2005). Las lesiones en el cerebro (meningoencefalitis no supurativa) se han descrito asociadas a la infección por ADV, pero sin signos clínicos (Jahns *et al.*, 2010).

La conrainmunolectroforesis (*Counter Immune Electrophoresis: CEP*) es la prueba serológica de elección para diagnosticar AD. La infección en visones adultos se clasifica en 2 categorías: progresiva, caracterizada por lesiones graves y por unos valores altos de CEP (título > 256) y gammaglobulinas (> 20% de las proteínas totales); y no progresiva, caracterizada por un título CEP bajo, una fracción de gammaglobulinas normal y ausencia de lesiones (Jackson *et al.*, 1996a).

La infección en visones se detecta antes por PCR que por serología (Jackson *et al.*, 1996a), pero existen excepciones. Algunos visones inicialmente tienen cantidades altas de ADN viral, que luego disminuyen hasta casi desaparecer y más tarde pueden volver a aparecer (Jackson *et al.*, 1996a). La supresión parcial de la excreción del virus, o bien el secuestro de éste, ocurre en las fases tempranas de la infección, asociados a la respuesta inmunitaria contra el virus (Jackson *et al.*, 1996a). Los títulos altos de anticuerpos se asocian a lesiones más graves, pero el ADN viral todavía se puede recuperar de lesiones leves o incluso de órganos sin lesión (Jackson *et al.*, 1996a), aunque en estos casos el virus puede no ser detectado en sangre (Jackson *et al.*, 1996a).

Sin embargo, estos datos varían dependiendo de las cepas del virus y de la variedad de visón (Jackson *et al.*, 1996a; Jackson *et al.*, 1996b). En ocasiones la correlación puede ser mala entre ADN viral y lesiones renales, o entre CEP y lesiones renales (Jackson *et al.*, 1996a). Además, las

lesiones en el hígado y en el riñón no necesariamente se correlacionan entre sí (Jackson *et al.*, 1996a).

La eficacia de la transmisión del virus por aerosol varía dependiendo de los diferentes estudios científicos (Jackson *et al.*, 1996a; Jackson *et al.*, 1996b). Algunos estudios han sido incapaces de infectar visones seronegativos cuando se han colocado en jaulas donde previamente habían vivido visones infectados, lo que ha llevado a sugerir que el virus no parece ser muy contagioso (Jackson *et al.*, 1996a). Sin embargo, otros estudios han concluido que el virus se disemina rápidamente en granjas y que la transmisión por aerosol es importante (Jackson *et al.*, 1996b); al menos en algunos de estos casos, la infección se ha favorecido por la falta de medidas higiénicas. El virus puede detectarse en saliva, orina y heces (Jackson *et al.*, 1996b). La infección (detección de anticuerpos y genoma viral) se ha documentado en granjeros que trabajan con visones y la enfermedad en personas se ha sospechado en algunas ocasiones (Jepsen *et al.*, 2009).

Las vacunas han tenido poco éxito a la hora de prevenir la infección y la enfermedad (Aasted *et al.*, 1998; Castelruiz *et al.*, 2005). Algunos protocolos terapéuticos han tenido cierto éxito, principalmente utilizando fármacos inmunosupresores como la ciclofosfamida (Cheema *et al.*, 1972). Los implantes de melatonina han mostrado alguna acción de protección frente a AD, probablemente por la capacidad de la melatonina de inactivar radicales libres, aunque también debe considerarse la capacidad de la melatonina de inducir enzimas antioxidativas y de modular la respuesta inmunitaria (Ellis, 1996).

2.3.2. Enfermedad aleutiana en hurones

Las cepas de ADV propias del hurón constituyen un grupo diferente a las cepas del visón (Murakami *et al.*, 2001). Las cepas de ADV altamente patógenas en visones no lo son en hurones y producen una escasa respuesta de anticuerpos, sin hipergammaglobulinemia, con eliminación del virus después de 12 días de la infección y con el desarrollo de lesiones leves que no son definitivas de AD (Porter *et al.*, 1982). En estos hurones, la hiperplasia linfoide fue muy manifiesta en el 28% de los animales y fue leve o moderada en el 66%; sin embargo, el 31% de los hurones control también presentaron hiperplasia linfoide leve-moderada (Porter *et al.*, 1982). De hecho, establecer una relación directa entre AD y los infiltrados linfocíticos es difícil, pues los hurones controles también pueden mostrar lesiones hepáticas (Kenyon *et al.*, 1967).

Cuando se determinó el nivel de anticuerpos contra ADV en un estudio con hurones, los animales positivos tenían un nivel de gammaglobulinas significativamente más alto que los animales negativos, pero incluso en los animales positivos el nivel de gammaglobulinas era generalmente menor de 1,5 g/dL (Porter *et al.*, 1982). En cambio, los hurones inoculados con una cepa de hurón de ADV desarrollaron una mayor respuesta de anticuerpos, con un aumento más marcado de las gammaglobulinas y lesiones más graves que cuando se inocularon con una cepa de ADV de visón (Porter *et al.*, 1982). Sin embargo, incluso con la cepa de hurón, las gammaglobulinas no estaban lo suficientemente elevadas como para definir una hipergammaglobulinemia, y solo algunos casos mostraban niveles de gammaglobulinas entre 2 y 3 g/dL a los 120 días p.i.; estos niveles disminuían progresivamente con el tiempo, pero siempre se mantenían más elevados que en los hurones no inoculados (Porter *et al.*, 1982).

Las lesiones en hurones inoculados con ADV de hurón fueron más graves que en hurones no inoculados o que en hurones infectados con ADV de visón, y fueron incapaces de producir signos clínicos o la muerte del animal (Porter *et al.*, 1982). En este estudio, el nivel de anticuerpos se correlacionó, en algunos casos, de forma positiva con el nivel de hipergammaglobulinemia y la gravedad de las lesiones (Porter *et al.*, 1982). La formación de centros germinales en los infiltrados de células linfoides se observó en hurones infectados, pero no en hurones no inoculados, y la proliferación de los conductos biliares, una lesión frecuente en visones con AD, no se observó en hurones inoculados con alguna de las cepas de ADV (Porter *et al.*, 1982).

La seroprevalencia en hurones domésticos puede variar del 6% al 60% (Fox *et al.*, 1998; Oxenham, 1990; Porter *et al.*, 1982; Welchman *et al.*, 1993); de acuerdo con estos resultados, la prevalencia es significativamente mayor en los Estados Unidos que en el Reino Unido, y es probablemente mayor en situaciones con sobrepoblación de hurones, como granjas, refugios o laboratorios de investigación. A pesar de estas altas seroprevalencias, los posibles casos espontáneos de AD en hurones se han referenciado muy poco en la literatura, y algunos patólogos especializados opinan que la enfermedad es muy rara en hurones domésticos (Michael Garner, comunicación personal, 2009). Los casos clínicos pueden mostrar disnea, paresis del tercio posterior, disfunción neurológica, pérdida progresiva de condición corporal, muerte súbita, disfunción renal y melena (Fox *et al.*, 1998; Stevenson *et al.*, 2001; Une *et al.*, 2000). La hipergammaglobulinemia es frecuente en estos casos clínicos (Fox *et al.*, 1998; Stevenson *et al.*, 2001), pero no siempre está presente (Une *et al.*, 2000). También se ha referenciado que la hipergammaglobulinemia es más monoclonal en hurones que en visones (Kenyon *et al.*, 1967).

2.3.3. Enfermedad aleutiana en otras especies

Además de en visones americanos de granja y en hurones domésticos, la AD se ha descrito en mofetas cautivas (*Mephitis mephitis*) (Allender *et al.*, 2008; Pennick *et al.*, 2007) y se ha sospechado en humanos (Jepsen *et al.*, 2009) y en una nutria salvaje (*Lutra lutra*) (Wells *et al.*, 1989). También se han citado lesiones compatibles con AD en una mofeta salvaje atropellada (Woolf y Gremillionsmith, 1986). En las mofetas cautivas, los signos clínicos de la enfermedad han consistido en letargo, muerte súbita, pirexia, temblores faciales, eritema, azotemia e hiperglobulinemia, con lesiones histológicas compatibles con AD (Allender *et al.*, 2008; Pennick *et al.*, 2007). El ADV obtenido de mofetas enfermas ha sido genéticamente diferente a otros ADV (Allender *et al.*, 2008).

Se han encontrado anticuerpos frente a ADV en varias especies de carnívoros salvajes. En el suroeste de Francia, se detectaron anticuerpos por CEP en el 23% de los visones americanos asilvestrados, el 12% de los visones europeos (*Mustela lutreola*), el 11% de los turones (*Mustela putorius*), el 24% de las garduñas (*Martes foina*), el 6% de las martas (*Martes martes*) y el 4% de las ginetas (*Genetta genetta*) (Fournier-Chambrillon *et al.*, 2004). La seroprevalencia fue significativamente más alta en visones americanos respecto a las otras especies (si bien hay que tener en cuenta que el tamaño muestral de las garduñas era demasiado bajo para ser significativo) (Fournier-Chambrillon *et al.*, 2004). Se encontraron carnívoros nativos seropositivos fuera del área de distribución del visón americano, sin mostrar diferencias en su condición física con los seronegativos (Fournier-Chambrillon *et al.*, 2004). La hipergammaglobulinemia (gammaglobulinas > 20%) se observó en todas las especies excepto en turones, por lo que se sugirió que la infección puede ser no patogénica en esta especie, aunque el trabajo no realizó una

correlación entre el estado serológico y el nivel de gammaglobulinas (Fournier-Chambrillon *et al.*, 2004).

En otro estudio realizado en España y utilizando CEP, todos los visones europeos (90 animales) fueron negativos para ADV, y un 10% de estos animales presentaron hipergammaglobulinemia (Guzmán *et al.*, 2008). Este trabajo se desarrolló en un área sin visón americano. En la misma investigación, las necropsias realizadas en 23 visones europeos no detectaron ninguna lesión característica de AD, aunque no se realizó PCR o hibridación *in situ* en tejidos (Guzmán *et al.*, 2008).

Otro estudio realizado en España utilizando CEP no detectó anticuerpos para ADV en visones americanos (14 animales), pero el 25% de los 12 visones europeos analizados fueron positivos (Mañas *et al.*, 2001). Todos estos animales, excepto un visón americano, mostraron un nivel de gammaglobulinas < 20% (Mañas *et al.*, 2001). Este estudio también detectó que cuatro de siete animales (una nutria europea, un visón europeo y cinco visones americanos) tenían ADN de ADV en muestras homogenizadas de órganos; de estos cuatro animales positivos (dos visones americanos, un visón europeo y una nutria europea), solo un visón americano atropellado presentó lesiones compatibles con AD (Mañas *et al.*, 2001). Las cepas obtenidas de este estudio eran diferentes a las cepas de ADV que se habían obtenido previamente en Estados Unidos y Europa (Mañas *et al.*, 2001).

Otro estudio mostró que el 50% de los visones americanos asilvestrados de Inglaterra presentaban anticuerpos contra ADV (Yamaguchi y Macdonald, 2001). La prevalencia por edades fue 0% en animales juveniles y 70% en animales adultos; se sugirió que los animales jóvenes morían por la enfermedad (Yamaguchi y Macdonald, 2001). El visón americano salvaje

también es susceptible a la inducción experimental de AD (Kenyon *et al.*, 1967) y puede ser portador de la enfermedad e infectar visones de granja (Gunnarsson, 2001); sin embargo, las citas de AD en visones americanos salvajes han sido escasas.

2.4. Referencias bibliográficas

Aasted B, Alexandersen S, Christensen J. 1998. Vaccination with Aleutian mink disease parvovirus (AMDV) capsid proteins enhances disease, while vaccination with the major non-structural AMDV protein causes partial protection from disease. *Vaccine*, 16: 1158-1165.

Addie DD, Jarrett O. 1992. A study of naturally occurring feline coronavirus infection in kittens. *Veterinary Record*, 130: 133-137.

Addie DD, Jarrett O. 2006. Feline coronavirus infections. *En* Greene CE (ed): *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3a ed. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, Estados Unidos: 88-102.

Allender MC, Schumacher J, Thomas KV, McCain SL, Ramsay EC, James EW, Wise AG, Maes RK, Reel D. 2008. Infection with Aleutian disease virus-like virus in a captive striped skunk. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232: 742-746.

Appel MJG. 1987. Canine distemper virus. *En* Appel MJG (ed): *Virus Infections of Carnivores*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Holanda: 133-159.

- Appel MJG, Reggiardo C, Summers BA, Pearcekelling S, Mare CJ, Noon TH, Reed RE, Shively JN, Orvell C. 1991. Canine distemper virus infection and encephalitis in javelinas (collared peccaries). *Archives of Virology*, 119: 147-152.
- Appel MJG, Summers BA. 1995. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Veterinary Microbiology*, 44: 187-191.
- Barrett I, Wohlsein P, Bidewell CA, Rowell SF. 2004. Canine distemper virus in a Californian sea lion (*Zalophus californianus*). *Veterinary Record*, 154: 334-336.
- Belfield WO. 1967. Vitamin C in treatment of canine and feline distemper complex. *Veterinary Medicine & Small Animal Clinician*, 62: 345-348.
- Best SM, Bloom ME. 2005. Pathogenesis of Aleutian mink disease parvovirus and similarities to B19 infection. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 52: 331-334.
- Blair EM, Chambers MA, King HA. 1998. Treating distemper in a young ferret. *Veterinary Medicine*, 93: 655-658.
- Burger D, Gorham JR. 1964. Response of ferrets and mink to vaccination with chicken embryo-adapted distemper virus. *Archiv für die Gesamte Virusforschung*, 4: 449-461.
- Castelruiz Y, Blixenkron-Moller M, Aasted B. 2005. DNA vaccination with the Aleutian mink disease virus NS 1 gene confers partial protection against disease. *Vaccine*, 23: 1225-1231.

- Cheema A, Gorham JR, Henson JB. 1972. Aleutian disease of mink - prevention of lesions by immunosuppression. *American Journal of Pathology*, 66: 543-552.
- Cheng F, Chen AY, Best SM, Bloom ME, Pintel D, Qiu JM. 2010. The capsid proteins of Aleutian Mink Disease Virus activate caspases and are specifically cleaved during infection. *Journal of Virology*, 84: 2687-2696.
- Chin S-C, Guo JC, Chen SY, Yu P-H, Chie C-H, Liu CH, Yeh LS. 2008. A review of Formosan pangolin (*Manis pentadactyla pentadactyla*) necropsies at the Taipei Zoo. *Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians*. Los Angeles, California, Estados Unidos. p 236.
- Crook E, Gorham JR, McNutt SH. 1958. Experimental distemper in mink and ferrets. 1. Pathogenesis. *American Journal of Veterinary Research*, 19: 955-957.
- Daoust PY, Hunter DB. 1978. Spontaneous Aleutian disease in ferrets. *Canadian Veterinary Journal*, 19: 133-135.
- Davidson M. 1986. Canine distemper virus infection in the domestic ferret. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 8: 448-453.
- Ellis LC. 1996. Melatonin reduces mortality from Aleutian disease in mink (*Mustela vison*). *Journal of Pineal Research*, 21: 214-217.
- Evermann JF, Heeney JL, Roelke ME, McKeirnan AJ, O'Brien SJ. 1988. Biological and pathological consequences of feline infectious peritonitis virus-infection in the cheetah. *Archives of Virology*, 102: 155-171.

- Evermann JF, Leathers CW, Gorham JR, McKeirnan AJ, Appel MJG. 2001. Pathogenesis of two strains of lion (*Panthera leo*) morbillivirus in ferrets (*Mustela putorius furo*). *Veterinary Pathology*, 38: 311-316.
- Fournier-Chambrillon C, Aasted B, Perrot A, Pontier D, Sauvage F, Artois M, Cassiede JM, Chauby X, Dal Molin A, Simon C, Fournier P. 2004. Antibodies to aleutian mink disease parvovirus in free-ranging European mink (*Mustela lutreola*) and other small carnivores from Southwestern France. *Journal of Wildlife Diseases*, 40: 394-402.
- Fox JG, Pearson RC, Gorham JR. 1998. Viral diseases. *En* Fox JG (ed): *Biology and Diseases of the Ferret*. 2a ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, Estados Unidos: 355-374.
- Gill JM, Hartley WJ, Hodgkinson NL. 1988. An outbreak of post-vaccinal suspected distemper-like encephalitis in farmed ferrets (*Mustela putorius furo*). *New Zealand Veterinary Journal*, 36: 173-176.
- Gorham JR. 1999. Some experiments and field observations of distemper in mink and ferrets. *En* Schultz RD (ed): *Advances in Veterinary Medicine, Vol 41 - Veterinary Vaccines and Diagnostics*: 557-570.
- Gorham JR, Evermann JF, Ward A, Pearson R, Shen D, Hartsough GR, Leathers C. 1990. Detection of coronavirus-like particles from mink with epizootic catarrhal gastroenteritis. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 54: 383-384.
- Greene CE, Appel MJ. 2006. Canine distemper. *En* Green CE (ed): *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3a ed. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, Estados Unidos: 25-41.

- Gunnarsson E. 2001. Documenting freedom from disease and re-establishing a free status after a breakdown Aleutian disease (Plasmacytosis) in farmed mink in Iceland. *Acta Veterinaria Scandinavica* 87-87.
- Guzmán DSM, Carvajal A, García-Marín JF, Ferreras MC, Pérez V, Mitchell M, Urra F, Ceña JC. 2008. Aleutian disease serology, protein electrophoresis, and pathology of the European mink (*Mustela lutreola*) from Navarra, Spain. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 39: 305-313.
- Hartsough GR, Gorham JR. 1956. Aleutian disease in mink. *National Fur News*, 28: 10-11.
- Harvey CJ, López JW, Hendrick MJ. 1996. An uncommon intestinal manifestation of feline infectious peritonitis: 26 cases (1986-1993). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 209: 1117-1120.
- Have P, Moving V, Svansson V, Uttenthal A, Bloch B. 1992. Coronavirus infection in mink (*Mustela vison*) - Serological evidence of infection with a coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus. *Veterinary Microbiology*, 31: 1-10.
- Herrewegh AAPM, Mahler M, Hedrich HJ, Haagmans BL, Egberink HF, Horzinek MC, Rottier PJ, de Groot RJ. 1997. Persistence and evolution of feline coronavirus in a closed cat-breeding colony. *Virology*, 234: 349-363.
- Hoefler HL. 2004. General gastrointestinal disorders. *En* Quesenberry KE, Carpenter JW (eds): *Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery* (2a ed). Saunders, St. Louis, Missouri, Estados Unidos: 25-33.

- Ishida T, Shibanaï A, Tanaka S, Uchida K, Mochizuki M. 2004. Use of recombinant feline interferon and glucocorticoid in the treatment of feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 6: 107-109.
- Jackson MK, Ellis LC, Morrey JD, Li ZZ, Barnard DL. 1996a. Progression of Aleutian disease in natural and experimentally induced infections of mink. *American Journal of Veterinary Research*, 57: 1753-1758.
- Jackson MK, Winslow SG, Dockery LD, Jones JK, Sisson DV. 1996b. Investigation of an outbreak of Aleutian disease on a commercial mink ranch. *American Journal of Veterinary Research*, 57: 1706-1710.
- Jahns H, Daly P, McElroy MC, Sammin DJ, Bassett HF, Callanan JJ. 2010. Neuropathologic features of Aleutian disease in farmed mink in Ireland and molecular characterization of Aleutian mink disease virus detected in brain tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22: 101-105.
- Jepsen JR, d'Amore F, Baandrup U, Clausen MR, Gottschalck E, Aasted B. 2009. Aleutian Mink Disease Virus and Humans. *Emerging Infectious Diseases*, 15: 2040-2042.
- Jones L, Tenorio E, Gorham J, Yilma T. 1997. Protective vaccination of ferrets against canine distemper with recombinant pox virus vaccines expressing the H or F genes of rinderpest virus. *American Journal of Veterinary Research*, 58: 590-593.
- Juan-Sallés C, Domingo M, Herráez P, Fernández A, Segalés J, Fernández J. 1998. Feline infectious peritonitis in servals (*Felis serval*). *Veterinary Record*, 143: 535-536.

- Kauffman CA, Bergman AG, Oconnor RP. 1982. Distemper virus infection in ferrets - an animal model of measles-induced immunosuppression. *Clinical and Experimental Immunology*, 47: 617-625.
- Kenyon AJ, Howard E, Buko L. 1967. Hypergammaglobulinemia in ferrets with lymphoproliferative lesions (Aleutian disease). *American Journal of Veterinary Research*, 28: 1167-1172.
- Kilham L, Habermann RT, Herman CM. 1956. Jaundice and bilirubinemia as manifestations of canine distemper in raccoons and ferrets. *American Journal of Veterinary Research*, 17: 144-148.
- Kiupel M, Perpiñán D. 2014. Viral diseases. *En* Fox JG y Marini RP (eds): *Biology and Diseases of the Ferret*. 3a ed. Wiley Blackwell, Danvers, Estados Unidos: 439-517.
- Lewington JH. 2007. *Ferret Husbandry, Medicine and Surgery*. Philadelphia, Estados Unidos: Saunders. 521 p.
- López-Peña M, Vázquez S, Alemán N, López-Beceiro A, Muñoz F, Pereira JL, Nieto JM. 2001. Canine distemper in a genet (*Genetta genetta*), associated with endogenous lipid pneumonia. *Journal of Comparative Pathology*, 124: 207-211.
- Mañas S, Ceña JC, Ruiz-Olmo J, Palazón S, Domingo M, Wolfenbarger JB, Bloom ME. 2001. Aleutian mink disease parvovirus in wild riparian carnivores in Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, 37: 138-144.

- Martínez J, Ramis AJ, Reinacher M, Perpiñán D. 2006. Detection of feline infectious peritonitis virus-like antigen in ferrets. *Veterinary Record*, 158: 523-523.
- McCaw DL, Hoskins JD. 2006. Canine viral enteritis. *En* Greene CE (ed): *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3a ed. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, Estados Unidos: 63-73.
- Murakami M, Matsuba C, Une Y, Nomura Y, Fujitani H. 2001. Nucleotide sequence and polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism analyses of Aleutian disease virus in ferrets in Japan. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13: 337-340.
- Murray J, Kiupel M, Maes RK. 2010. Ferret coronavirus-associated diseases. *Veterinary Clinics of North America-Exotic Animal Practice*, 13: 543-560.
- Oxenham M. 1990. Aleutian disease in the ferret. *Veterinary Record*, 126: 585-585.
- Pavlacik L, Celer V, Kajerova V, Jekl V, Knotek Z, Literak I. 2007. Monitoring of antibodies titre against canine distemper virus in ferrets vaccinated with a live modified vaccine. *Acta Veterinaria Brno*, 76: 423-429.
- Pedersen NC. 1995. An overview of feline enteric coronavirus and infectious peritonitis virus infections. *Feline Practice*, 23: 7-20.
- Pennick KE, Latimer KS, Brown CA, Hayes JR, Sarver CF. 2007. Aleutian disease in two domestic striped skunks (*Mephitis mephitis*). *Veterinary Pathology*, 44: 687-690.

- Pennick KE, Stevenson MAM, Latimer KS, Ritchie BW, Gregory CR. 2005. Persistent viral shedding during asymptomatic Aleutian mink disease parvoviral infection in a ferret. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17: 594-597.
- Porter HG, Porter DD, Larsen AE. 1982. Aleutian disease in ferrets. *Infection and Immunity*, 36: 379-386.
- Provacía LBV, Smits SL, Martina BE, Raj VS, Doel P, Amerongen G, Moorman-Roest H, Osterhaus ADME, Haagmans BL. 2011. Enteric coronavirus in ferrets, The Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 17: 1570-1571.
- Rabenau HF, Kampf G, Cinatl J, Doerr HW. 2005. Efficacy of various disinfectants against SARS coronavirus. *Journal of Hospital Infection*, 61: 107-111.
- Rodeheffer C, von Messling V, Milot S, Lepine F, Manges AR, Ward BJ. 2007. Disease manifestations of canine distemper virus infection in ferrets are modulated by vitamin A status. *Journal of Nutrition*, 137: 1916-1922.
- RoelkeParker ME, Munson L, Packer C, Kock R, Cleaveland S, Carpenter M, O'Brien SJ, Pospischil A, HofmannLehmann R, Lutz H, Mwamengele GLM, Mgasá MN, Machange GA, Summers BA, Appel MJG. 1996. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature*, 379: 441-445.
- Roscoe DE. 1993. Epizootiology of canine distemper in New Jersey raccoons. *Journal of Wildlife Diseases*, 29: 390-395.

- Rosenthal KL. 2004. Respiratory diseases. *En* Quesenberry KE, Carpenter JW (eds): Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery. 2a ed. Saunders, St. Louis, Estados Unidos: 72-78.
- Shen DT, Gorham JR. 1978. Contact transmission of distemper virus in ferrets. *Research in Veterinary Science*, 24: 118-119.
- Stanton JB, Givens L, Evermann JF, Brown CC. 2003. Immunohistochemical analysis of two strains of lion (*Panthera leo*)-adapted canine distemper virus in ferrets (*Mustela putorius furo*). *Veterinary Pathology*, 40: 464-467.
- Stephensen CB, Welter J, Thaker SR, Taylor J, Tartaglia J, Paoletti E. 1997. Canine distemper virus (CDV) infection of ferrets as a model for testing Morbillivirus vaccine strategies: NYVAC- and ALVAC-based CDV recombinants protect against symptomatic infection. *Journal of Virology*, 71: 1506-1513.
- Stevenson M, Gates L, Murray J, Bloom ME. 2001. Aleutian mink disease parvovirus: Implications for companion ferrets. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 23: 178-185.
- Stoddart ME, Gaskell RM, Harbour DA, Gaskell CJ. 1988. Virus shedding and immune responses in cats inoculated with cell culture-adapted feline infectious peritonitis virus. *Veterinary Microbiology*, 16: 145-158.
- Sudfeld CR, Navar AM, Halsey NA. 2010. Effectiveness of measles vaccination and vitamin A treatment. *International Journal of Epidemiology*, 39: 48-55.

- Sun ZZ, Li AX, Ye HH, Shi YS, Hu ZM, Zeng L. 2010. Natural infection with canine distemper virus in hand-feeding Rhesus monkeys in China. *Veterinary Microbiology*, 141: 374-378.
- Une Y, Wakimoto Y, Nakano Y, Konishi M, Nomura Y. 2000. Spontaneous Aleutian disease in a ferret. *Journal of Veterinary Medical Science*, 62: 553-555.
- Van den Brand JMA, Haagmans BL, Leijten L, Van Riel D, Martina BEE, Osterhaus A, Kuiken T. 2008. Pathology of experimental SARS coronavirus infection in cats and ferrets. *Veterinary Pathology*, 45: 551-562.
- Vennema H, Poland A, Hawkins KF, Pedersen NC. 1995. A comparison of the genomes of FECVs and FIPVs and what they tell us about the relationship between feline coronaviruses and their evolution. *Feline Practice*, 23: 40-44.
- Vennema H, Poland A, Foley J, Pedersen NC. 1998. Feline infectious peritonitis viruses arise from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology*, 243: 150-157.
- von Messling V, Springfield C, Devaux P, Cattaneo R. 2003. A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *Journal of Virology*, 77: 12579-12591.
- Welchman DD, Oxenham M, Done SH. 1993. Aleutian disease in domestic ferrets - diagnostic findings and survey results. *Veterinary Record*, 132: 479-484.
- Wells GAH, Keymer IF, Barnett KC. 1989. Suspected Aleutian disease in a wild otter (*Lutra lutra*). *Veterinary Record*, 125: 232-235.
- Williams ES. 2001. Canine distemper. *En Williams ES, Barker IK (eds): Infectious Diseases of Wild Mammals*. 3a ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, Estados Unidos: 50-59.

- Williams ES, Anderson SL, Cavender J, Lynn C, List K, Hearn C, Appel MJG. 1996. Vaccination of black-footed ferret (*Mustela nigripes*) x Siberian polecat (*M. eversmanni*) hybrids and domestic ferrets (*M. putorius furo*) against canine distemper. *Journal of Wildlife Diseases*, 32: 417-423.
- Williams BH, Kiupel M, West KH, Raymond JT, Grant CK, Glickman LT. 2000. Coronavirus-associated epizootic catarrhal enteritis in ferrets. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217: 526-530.
- Wimsatt J, Biggins D, Innes K, Taylor B, Garell D. 2003. Evaluation of oral and subcutaneous delivery of an experimental canarypox recombinant canine distemper vaccine in the Siberian polecat (*Mustela eversmanni*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 34: 25-35.
- Wimsatt J, Jay MT, Innes KE, Jessen MJ, Collins JK. 2001. Serologic evaluation, efficacy, and safety of a commercial modified-live canine distemper vaccine in domestic ferrets. *American Journal of Veterinary Research*, 62: 736-740.
- Wise AG, Kiupel M, Garner MM, Clark AK, Maes RK. 2010. Comparative sequence analysis of the distal one-third of the genomes of a systemic and an enteric ferret coronavirus. *Virus Research*, 149: 42-50.
- Wise AG, Kiupel M, Maes RK. 2006. Molecular characterization of a novel coronavirus associated with epizootic catarrhal enteritis (ECE) in ferrets. *Virology*, 349: 164-174.
- Woolf A, Gremillionsmith C. 1986. Pathological findings in rabies-suspect, random-source, and accidentally killed skunks. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 189: 1089-1091.

Yamaguchi N, Macdonald DW. 2001. Detection of Aleutian disease antibodies in feral American mink in southern England. *Veterinary Record*, 149: 485-488.

3. OBJETIVOS

El hurón doméstico es un mustélido con una serie de usos por parte del hombre. A partir de la década de los años 60 del siglo XX, esta especie adquirió un papel relevante como animal de experimentación y se ha utilizado para estudiar la influenza y el moquillo. También se ha utilizado en menor medida para estudiar otros agentes infecciosos, en investigación cardiovascular, en ingeniería genética o como modelo de estudio de los órganos de los sentidos como la visión y la audición.

El hurón ha experimentado un aumento espectacular en las últimas dos décadas como animal de compañía y actualmente es uno de los animales exóticos más importantes para las clínicas veterinarias en muchos países. Históricamente, y todavía en algunas zonas, el hurón se utiliza para la caza del conejo en madriguera.

Las enfermedades víricas producen enfermedad y mortalidad importantes en hurones. La mortalidad de hurones enfermos por moquillo canino o por coronavirus sistémico es cercana al 100%. Aunque la mortalidad por la enfermedad aleutiana es variable y los mecanismos de acción todavía no son muy bien conocidos, su prevalencia es muy alta en algunas poblaciones. Para algunas de estas enfermedades, como por ejemplo el moquillo canino o la enfermedad aleutiana, existen numerosas referencias de infecciones experimentales en hurones, pero son muy escasas aquellas en las que se describen infecciones naturales, de ahí el objetivo general y los objetivos específicos de la presente tesis doctoral.

El **objetivo general** de esta tesis doctoral es contribuir al conocimiento de las enfermedades víricas en hurones a través de la investigación de las infecciones naturales espontáneas.

Los **objetivos específicos** de esta tesis doctoral son:

1. Investigar y describir las características clínicas de un brote de moquillo canino en hurones y compararlas con el material publicado referente a infecciones experimentales en esta especie.
2. Investigar y describir las características clínicas de la enfermedad producida por un coronavirus sistémico en hurones.
3. Investigar y describir las lesiones microscópicas de la enfermedad por coronavirus sistémico en hurones y su relación con el antígeno de coronavirus tipo 1.
4. Investigar la relación entre sintomatología, lesiones microscópicas, PCR, serología e hibridación *in situ* en la enfermedad aleutiana en hurones.

4. BROTE DE MOQUILLO CANINO EN HURONES DOMÉSTICOS

4.1. Introducción

En 2006 se detectó un brote de moquillo canino en hurones en la ciudad de Barcelona (España). La mayoría de esos hurones provenían de una sola granja, y partir de aquí presumiblemente se afectaron hurones en toda la cadena de distribución (tiendas de animales y propietarios). La investigación de ese brote proporcionó información nueva y útil para comprender la transmisión, epidemiología, signos clínicos y tratamiento del moquillo en hurones.

4.2. Material y métodos

En el presente estudio se incluyeron 14 hurones que contrajeron moquillo canino. Todos los casos fueron animales de menos de un año, la mayoría habían nacido en el extranjero y habían sido destetados, identificados con microchip, vacunados contra la rabia, esterilizados y enviados a España con menos de dos meses de edad. En España se habían mantenido en una granja con posible contacto con otras especies (perros, gatos, conejos, roedores, aves y reptiles) hasta el día de su venta a las tiendas de animales.

Los hurones identificados del 1 al 6 habían sido comprados por una persona (propietario final) directamente de la granja y fueron llevados a su casa, donde se mantuvieron en contacto con otro hurón joven que no había sido vacunado del moquillo; este hurón había nacido en una casa particular en España y no desarrolló moquillo, a pesar de estar en contacto con los otros seis durante 38 días. Los hurones identificados del 7 al 14 se distribuyeron a tiendas de animales de compañía y de ahí pasaron a casas particulares (propietario final). Todos los propietarios informaron que sus hurones se mantuvieron en el interior de una casa/piso sin contacto con

perros no vacunados o con otros hurones. Tres animales (8, 11 y 14) fueron vacunados de moquillo con una vacuna atenuada de origen aviar (Caniffa MH, Merial) pero desarrollaron síntomas clínicos de 11 a 20 días después de la vacunación (Tabla 4.1).

Hurón	Sexo	Origen	Nacimiento	Compra	Inicio síntomas	Muerte	Diagnóstico	Otra información
1	♀	Desconocido*	24/01/2006	08/03/2006	08/03/2006	24/03/2006	PCR	Presentado muerto
2	♀	Desconocido*	20/01/2006	08/03/2006	08/03/2006	08/04/2006†	Histología	Pulmones: <i>Enterobacter cloacae</i> e inclusiones compatibles con herpesvirus
3	♀	Desconocido*	08/01/2006	08/03/2006	29/03/2006	17/04/2006	Histología	
4	♀	Desconocido*	17/01/2006	08/03/2006	29/03/2006	18/04/2006	Histología	
5	♂	Desconocido*	13/01/2006	08/03/2006	29/03/2006	19/04/2006	Histología	
6	♂	Desconocido*	09/01/2006	08/03/2006	29/03/2006	19/04/2006	Histología	
7	♂	Desconocido	11/11/2005	10/03/2006	10/03/2006	29/03/2006†	IF	
8	♀	Holanda	03/01/2006	06/04/2006	01/06/2006	14/06/2006†	IF	Vacunado de moquillo el 19/05/2006
9	♀	Holanda	03/01/2006	20/04/2006	03/05/2006	22/05/2006†	Histología y PCR	
10	♀	Holanda	03/01/2006	29/04/2006	10/05/2006	29/05/2006†	IF	
11	♂	Desconocido	03/01/2006	10/04/2006	15/05/2006	08/06/2006†	IF	Vacunado de moquillo el 25/04/2006
12	♂	Holanda	11/02/2006	01/04/2006	12/04/2006	16/05/2006	Histología	Pulmones: <i>Escherichia coli</i>
13	♂	Holanda	Desconocido	11/04/2006	27/04/2006	23/05/2006†	IF	Pulmones: <i>Escherichia coli</i>
14	♂	Desconocido	01/02/2006			Sobrevivió	IF	Vacunado de moquillo el 04/07/2006

Tabla 4.1. Sexo, origen y cronología de la enfermedad en los 14 hurones afectados por moquillo

* Un país del norte de Europa de acuerdo con el vendedor

† Sacrificado

IF: Inmunofluorescencia directa

El hurón 14 desarrolló moquillo durante su estancia en la tienda de animales y el propietario no pudo proporcionar información precisa sobre las fechas de compra y aparición de signos clínicos.

4.3. Resultados

4.3.1. Signos clínicos

La primera observación que provocaba la preocupación de los propietarios era generalmente que sus hurones estaban aletargados (durmiendo más de lo normal), perdían el apetito y no ganaban peso. Otros signos clínicos tempranos fueron tos, estornudos, secreción oculonasal serosa, ojos semicerrados y disnea. Con el tiempo, la secreción serosa o catarral se volvía mucopurulenta, los párpados se quedaban pegados y el animal perdía la capacidad de abrir los ojos. El área perineal de algunos hurones se quedaba entonces manchada con heces pastosas o verdes.

En una fase más avanzada de la enfermedad se observaba prurito generalizado e intenso, que era seguido por descamación, particularmente en la zona interescapular y en la parte dorsal del cuello, y más tarde se desarrollaba hiperqueratosis (pequeñas costras). A medida que la enfermedad avanzaba se desarrollaba dermatitis en la zona perineal, en las almohadillas plantares y alrededor de los labios, nariz y párpados. Esta dermatitis se complicaba más tarde con hiperqueratosis y luego con la formación de un material costroso marrón, especialmente en la cara y, en menor medida, en la zona perineal y en las almohadillas plantares. Los hurones perdían progresivamente su condición corporal y mostraban un progresivo deterioro de la calidad del pelo. En la fase final de la enfermedad, los hurones desarrollaban costras muy extensas en la cara y disnea marcada (Fig. 4.1).

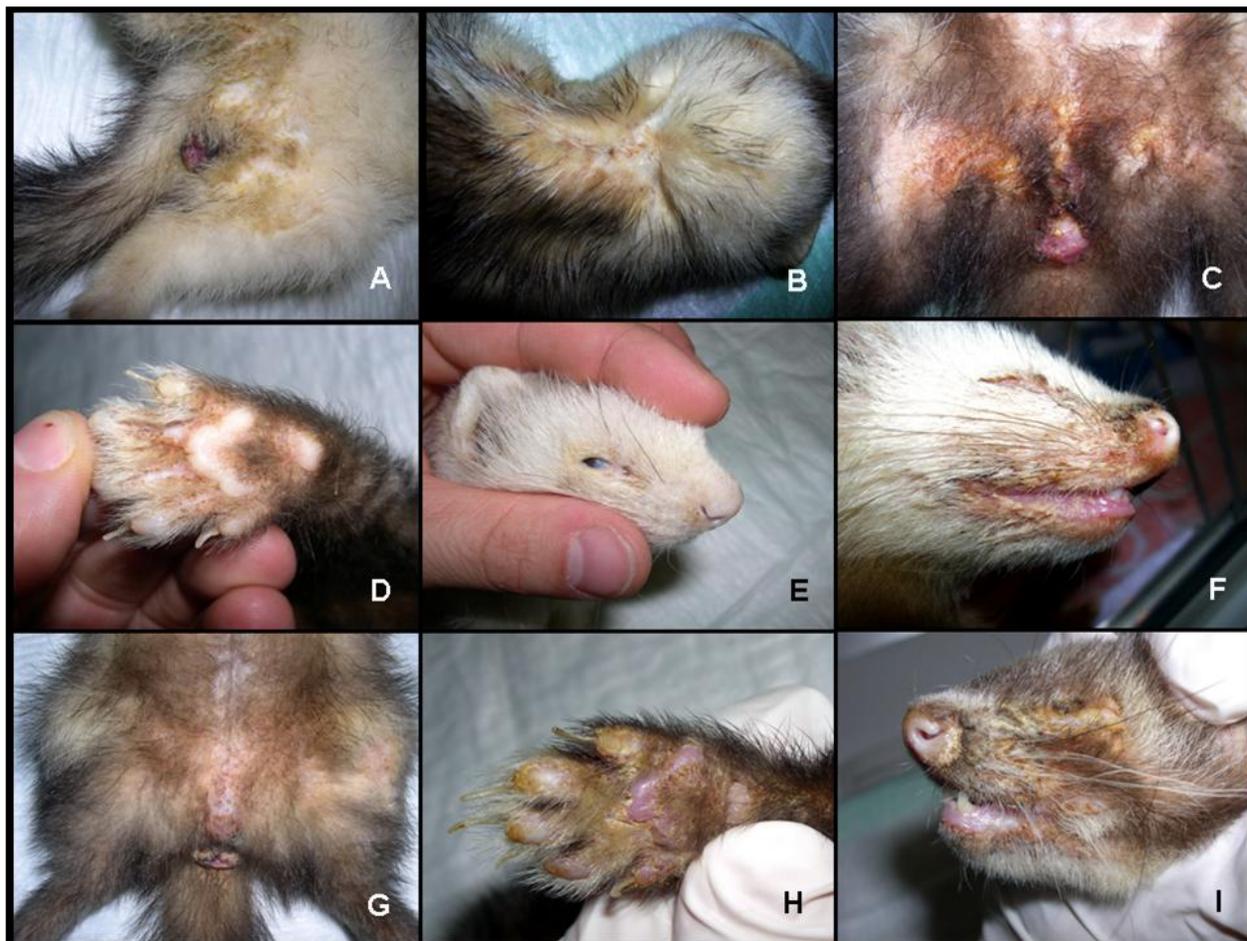


Figura 4.1. Lesiones externas en los hurones infectados con moquillo canino.

- A. Área perineal sucia.
- B. Descamación y costras en la zona cervical dorsal.
- C. Dermatitis en la zona perineal.
- D. Descamación en las almohadillas plantares.
- E. Ojos semicerrados y dermatitis alrededor de ojos y nostrilos.
- F. Dermatitis costrosa y exudados purulentos alrededor de labios, nostrilos y ojos.
- G. Dermatitis costrosa en la zona perineal.
- H. Hiperqueratosis y costras en las almohadillas plantares.
- I. Dermatitis costrosa grave en la cara.

4.3.2. Hallazgos clinicopatológicos

Durante la fase inicial de la enfermedad, la temperatura rectal de algunos hurones era alta, pero volvía a la normalidad en la fase intermedia de la enfermedad y se transformaba en hipotermia justo antes de la muerte del animal. La auscultación torácica podía revelar aumento de los sonidos pulmonares, y la frecuencia respiratoria en estos casos era siempre superior a 40 rpm y llegaba a 80 rpm en los casos avanzados de enfermedad. Durante la palpación abdominal era frecuente encontrar esplenomegalia y el análisis citológico de aspirados con aguja fina de tres de estos bazos mostró hematopoyesis extramedular.

Los cambios hematológicos durante las fases tempranas de la enfermedad consistieron en anemia leve no regenerativa en los cinco animales analizados, con valores hematocritos que variaban entre 0,30 y 0,36 l/l, valores de hemoglobina entre 106 y 114 g/l, y recuentos eritrocitarios entre $6,72$ y $7,12 \times 10^{12}$ células/l. No se encontraron reticulocitos en los dos animales en los que se realizaron tinciones vitales. En dos animales se observó neutrofilia ($8,2 \times 10^9/l$ y $12,3 \times 10^9/l$) y linfopenia ($0,9 \times 10^9/l$ y $1,3 \times 10^9/l$). Los resultados de bioquímica plasmática fueron normales para estos cinco hurones.

La citología de la médula ósea se realizó en un animal y mostró lesiones compatibles con hipoplasia eritroide con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en precursores eritroides. La electroforesis de proteínas mostró aumentos de las globulinas α y β en los tres animales analizados. La radiografía de dos hurones mostró aumento en la opacidad de los pulmones compatible con neumonía. Los resultados de la ecografía abdominal realizada en un hurón fueron normales. El cultivo de lavados bronquiales realizado en tres hurones mostró crecimientos de

Escherichia coli hemolítica en dos animales y *Enterobacter cloacae* en uno. El análisis coproparasitológico en cinco hurones mostró coccidios en cuatro de ellos (Fig. 4.2).

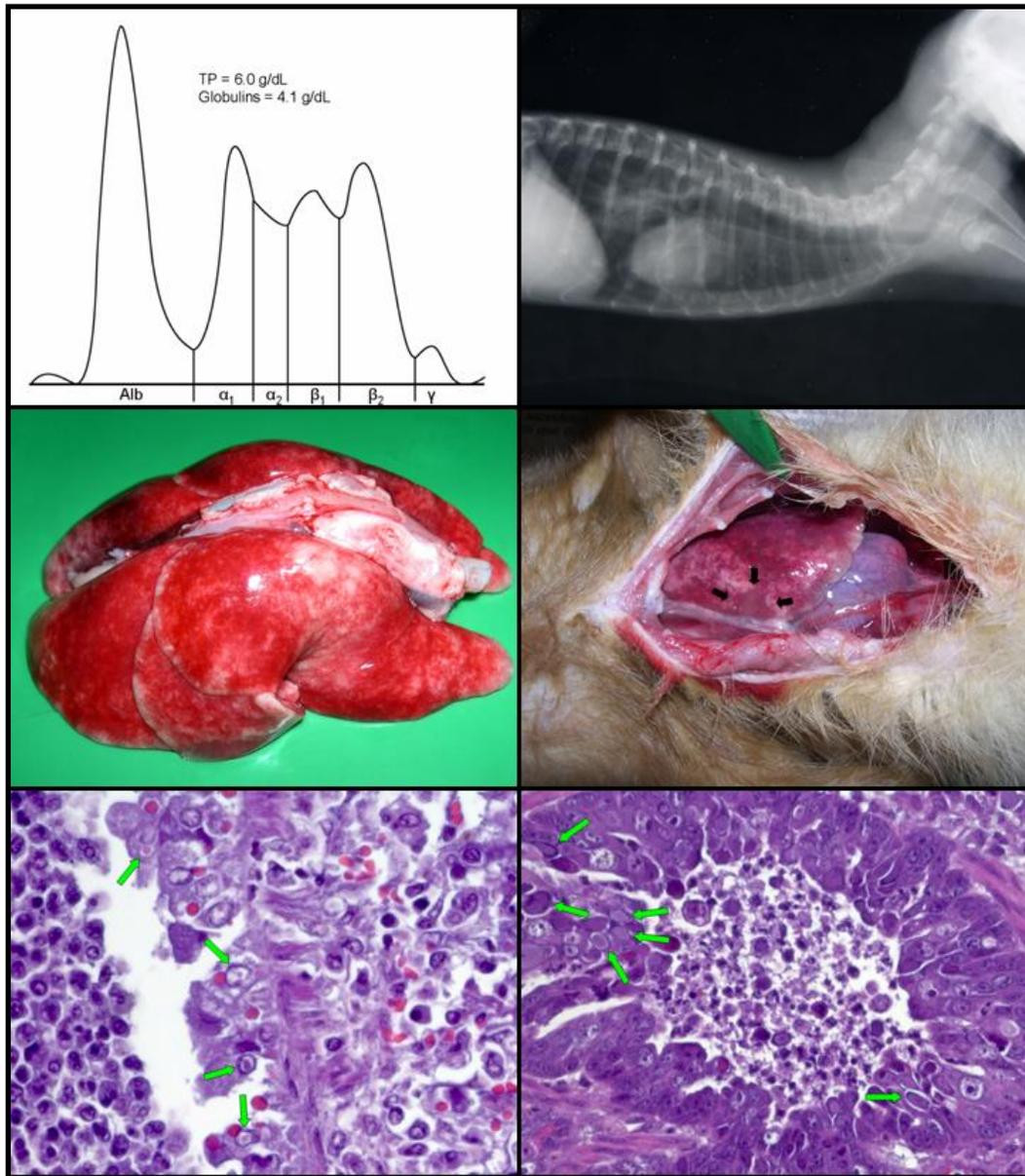


Figura 4.2. Hallazgos clinicopatológicos en los hurones infectados por moquillo canino.
 Arriba izquierda: Proteinograma mostrando elevaciones en las globulinas α y β .
 Arriba derecha: Radiografía mostrando infiltrados en el pulmón.
 Centro izquierda: Ausencia de colapso de los pulmones, indicando neumonía intersticial.
 Centro derecha: Foco de consolidación en un pulmón.
 Abajo izquierda: Epitelio bronquial mostrando cuerpos de inclusión del virus (flechas).
 Hematoxilina y eosina, $\times 400$.
 Abajo derecha: Epitelio bronquial mostrando cuerpos de inclusión compatibles con herpesvirus.
 Hematoxilina y eosina, $\times 400$.

4.3.3. Diagnóstico

Se realizó un diagnóstico presuntivo de moquillo basado en la historia y en los signos clínicos. Durante el brote, la mayoría de los hurones que habían tenido contacto con la granja de origen en España desarrollaron la enfermedad. El examen por inmunofluorescencia directa de secreciones oculares, nasales y orales fue positivo en seis animales vivos. Muestras de un animal vivo fueron positivas al utilizar el diagnóstico molecular por PCR. El resto de hurones se diagnosticaron después de la muerte utilizando histología en siete casos y PCR en uno.

Las necropsias mostraron que en ninguno de los hurones los pulmones se habían colapsado, pero se encontraron algunos focos de consolidación. Se observó esplenomegalia en algunos hurones. La histología de los casos 2 al 7, 11 y 12 presentó cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos/intranucleares y eosinofílicos característicos de replicación viral, particularmente en los pulmones y en la piel. En el hurón 2 se encontraron cuerpos de inclusión compatibles con una coinfección por herpesvirus.

Inicialmente, las lesiones microscópicas compatibles con una neumonía bacteriana en el hurón 1, el aislamiento de *E. cloacae* multirresistente en el hurón 2 y los signos respiratorios crónicos en los hurones 1 al 6 sin signos neurológicos condujeron erróneamente a un diagnóstico presuntivo de neumonía bacteriana por *E. cloacae*. Sin embargo, la poca respuesta al tratamiento y el desarrollo de una dermatitis grave en el hurón 2 (lo que llevó a su sacrificio) facilitó el diagnóstico definitivo de moquillo canino.

4.3.4. Tratamiento

El tratamiento consistió en antimicrobianos, broncodilatadores, mucolíticos, fluidoterapia y terapia de soporte. En casos puntuales se prescribieron glucocorticoides para aquellos hurones

con prurito intenso, aunque solo cuando los propietarios no deseaban realizar el sacrificio inmediatamente. El único hurón que sobrevivió había sido tratado con suero hiperimmune anti-CDV (Seromoquil; Laboratorios Iven) durante las fases tempranas de la enfermedad. Siete hurones fueron sacrificados en base a la disfunción respiratoria, el prurito intenso, el letargo y/o las extensas costras en la cara. Los otros seis hurones murieron de forma natural.

4.3.5. Periodos de incubación y curso de la enfermedad

Los hurones 1, 2 y 7 ya estaban enfermos cuando fueron adquiridos por sus propietarios. Los periodos de incubación mínimos (días entre la compra final del animal y el desarrollo de sintomatología) se calcularon para seis hurones que empezaron a mostrar sintomatología días o semanas después de la adquisición por el propietario final y sin contacto con otro animal tras su adquisición final (hurones 8-13). Los periodos variaron entre 11 y 56 días, con una mediana de 13,5 días. La duración de la enfermedad se calculó para los 13 hurones que murieron (hurones 1-13) y varió entre 14 y 34 días, con una mediana de 21 días. La edad al inicio de la sintomatología se calculó para 13 hurones (hurones 1-12 y 14) varió entre nueve y 24 semanas, con una mediana de 18 semanas. El brote duró tres meses, de abril a junio de 2006, periodo en el cual otros veterinarios de la ciudad de Barcelona reportaron un aumento del diagnóstico de moquillo en hurones.

4.4. Discusión

El moquillo canino es una enfermedad vírica grave con una mortalidad cercana al 100% en hurones (Fox *et al.*, 1998). Cuando la enfermedad se induce de forma experimental los periodos de incubación varían entre cuatro y nueve días (Evermann *et al.*, 2001; Kauffman *et al.*, 1982; Stephensen *et al.*, 1997; von Messling *et al.*, 2003; Welter *et al.*, 2000; Wimsatt *et al.*, 2001); sin

embargo, los periodos de incubación son difíciles de determinar durante un brote natural porque es muy difícil conocer el día exacto de la infección de cada animal (Williams *et al.*, 1988). La mayoría de los 14 hurones del estudio tuvieron periodos de incubación prolongados, que incluso excedieron de los 56 días en un caso. Se han observado periodos de incubación de hasta 52 días en hurones de pies negros (*Mustela nigripes*) que se infectaron y murieron de forma natural (Williams *et al.*, 1988).

Tres de los hurones que habían sido vacunados con una vacuna atenuada de origen aviar desarrollaron signos clínicos a los 11-20 días después de la vacunación. Este tipo de vacuna es segura en hurones y no induce moquillo post-vacunal (Appel, 1987; Appel y Summers, 1995). En los años anteriores y posteriores al brote descrito en esta tesis, el autor ha usado la misma vacuna de forma segura en más de 200 hurones, lo que apoya la idea de que el uso de la vacunación en estos tres hurones no fue la causa de la enfermedad. Probablemente estos tres hurones estaban incubando la enfermedad cuando fueron vacunados, y la vacuna no pudo tener ningún efecto protector o terapéutico, aunque pudo variar las características de la enfermedad. Sin embargo, se debe tener en cuenta la posibilidad de que hurones infectados de forma subclínica puedan desarrollar la enfermedad a consecuencia de la vacuna, pues se ha estimado que entre el 25 y el 75% de los perros infectados por el virus del moquillo desarrollan infecciones subclínicas (Greene y Appel, 2006).

Los signos clínicos y la progresión de la enfermedad observada en estos casos mostraron tanto similitudes como diferencias con respecto a las características del moquillo descrito previamente en hurones (Fox *et al.*, 1998; Rosenthal, 2004). Síntomas como la fiebre (especialmente en las fases tempranas de la enfermedad), la secreción oculonasal, la dermatitis costrosa, la

hiperqueratosis en las almohadillas plantares, la neumonía y la muerte se han descrito en la bibliografía (Fox *et al.*, 1998) y también se observaron en el presente brote.

La dermatitis pruriginosa, inicialmente en las zonas dorso-cervical e interescapular, y luego en la zona del rostro asociada a una dermatitis descamativa y costrosa, se ha citado de forma infrecuente en hurones con moquillo (Blair *et al.*, 1998; Davidson, 1986). El prurito intenso se ha citado como un signo común e inicial en turones de pies negros infectados de forma natural con moquillo canino (Williams *et al.*, 1988), pero este signo no se observa cuando la enfermedad es inducida por la vacuna (Carpenter *et al.*, 1976).

Los signos neurológicos son frecuentes (Blair *et al.*, 1998; Fox *et al.*, 1998; Gill *et al.*, 1988; Stephensen *et al.*, 1997) y generalmente son la causa de muerte o el motivo del sacrificio. Sin embargo, las diferentes cepas del virus muestran diferencias en su neurotropismo (Appel, 1987; Evermann *et al.*, 2001). Una infección experimental con una cepa atenuada del virus produjo enfermedad respiratoria con muerte de algunos hurones por neumonía, pero ninguno desarrolló signos neurológicos (Kauffman *et al.*, 1982).

Los turones de pies negros con moquillo post-vacunal desarrollaron signos neurológicos (Carpenter *et al.*, 1976), pero esos signos no aparecieron cuando la infección fue natural (Williams *et al.*, 1988). Ninguno de los hurones del presente estudio mostró signos neurológicos, ni siquiera en la fase final de la enfermedad. Todos sufrieron problemas respiratorios graves que fueron la principal causa de muerte o sacrificio. Sin embargo, los cerebros de estos hurones no se analizaron histológicamente y, por lo tanto, no se puede descartar la infección del sistema nervioso central. La neumonía fue la principal causa de muerte en hurones inoculados con una cepa atenuada del virus (Kauffman *et al.*, 1982), pero esta afectación respiratoria fue menos

frecuente e incluso ausente en los hurones inoculados con cepas más virulentas (Gill *et al.*, 1988, Stephensen *et al.*, 1997).

Se ha citado que la duración de la enfermedad es de 12 a 16 días para hurones infectados con las cepas de hurón, y de 21 a 35 días para hurones infectados con las cepas de perro (Fox *et al.*, 1998). La duración de la enfermedad durante el brote del presente trabajo fue similar a la duración descrita para cepas caninas, aunque en hurones infectados de forma natural por moquillo se han descrito periodos más largos (de hasta siete semanas) (Blair *et al.*, 1998).

A partir de lavados broncoalveolares de tres hurones se identificó *E. coli* hemolítica en dos de ellos y *E. cloacae* en el tercero. Ambas bacterias pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, que pueden encontrarse en el suelo, en el agua o en las heces y pueden inducir infecciones en situaciones de superpoblación y falta de higiene (Harbarth *et al.*, 1999; Quinn *et al.*, 1994). En hurones, se ha aislado *E. coli* hemolítica del intestino de animales tanto sanos como enfermos, lo que sugiere que el organismo forma parte de la microflora intestinal normal (Liberson *et al.*, 1983; Marini *et al.*, 2004). Aunque solo se realizaron cultivos bacterianos de tres hurones, se describieron lesiones macroscópicas compatibles con neumonía intersticial en todos los hurones examinados mediante necropsia y se consideró que todos los hurones estaban afectados por neumonías bacterianas secundarias, probablemente en asociación a condiciones de superpoblación y/o falta de higiene.

Además, en el pulmón del hurón 2 se encontraron cuerpos de inclusión compatibles con la infección por herpesvirus. El virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina se ha aislado de un hurón sano (Porter *et al.*, 1975), pero para los autores esta es la primera cita de inclusiones similares a herpesvirus en el pulmón de un hurón. No hubo diferencias clínicas significativas

entre el hurón con inclusiones compatibles con herpesvirus, los hurones con aislamiento de *E. cloacae* o *E. coli*, o el resto de hurones, por lo que la importancia de estos hallazgos en el brote estudiado es cuestionable y puede tratarse de infecciones secundarias.

Las variaciones biológicas entre las cepas del virus pueden influir en las características de la enfermedad que se produce, tanto en el periodo de incubación como en la duración, gravedad, tropismo neurológico e índices de mortalidad (Appel, 1987; Davidson, 1986; Evermann *et al.*, 2001). La especie, la edad y el estado inmunológico del animal infectado también juegan un papel en el desarrollo de la enfermedad (Appel, 1987). Tal como se ha descrito en el turón de pies negros (Carpenter *et al.*, 1976; Williams *et al.*, 1988), la cepa, la dosis infectiva y la vía de transmisión podrían ser las responsables de las diferencias clínicas observadas entre el moquillo post-vacunal, el inducido experimentalmente y el moquillo adquirido de forma natural, lo que también se describe en nuestro trabajo.

El estado inmunológico del hospedador también podría explicar la ausencia de signos clínicos en un hurón que vivió con seis de los hurones infectados (hurones 1-6) durante 38 días. Aquél había nacido en una casa privada en España y, a diferencia de los otros hurones, no había experimentado ningún episodio de estrés cuando tenía menos de dos meses de edad, como podría ser destete, vacunación de rabia, identificación mediante microchip, esterilización quirúrgica y viajes largos; como resultado, se podría considerar que su estado inmunológico le podría haber ayudado a superar una infección subclínica.

La tasa de mortalidad en hurones con moquillo pueden variar del 50% al 100% (Davidson, 1986), por lo que es recomendable iniciar un tratamiento. La administración de suero hiperinmune contra el moquillo canino merece consideración terapéutica debido a la eficacia

demostrada en el presente estudio en uno de los animales. Sin embargo, también hemos comprobado que, tal como afirman Evermann et al. (2001), es improbable que el tratamiento sea eficaz una vez que el hurón ha empezado a mostrar signos moderados o avanzados de la enfermedad.

Hemos de destacar que este brote de moquillo canino en hurones se caracterizó por prurito generalizado, periodos de incubación prolongados, ausencia de signos neurológicos y la presencia de neumonía como principal causa de muerte. Se cree que la cepa implicada era una cepa atenuada de moquillo canino, con coinfecciones por *E. cloacae*, *E. coli* y, posiblemente, un herpesvirus. La infección natural por moquillo en hurones puede diferir de forma significativa de la enfermedad inducida experimentalmente o por vacunación, y los veterinarios deben estar atentos a las posibles variaciones del curso clínico de la enfermedad en hurones para poder diagnosticarla de forma correcta. La vacunación es vital para la prevención de esta enfermedad en hurones.

4.5. Referencias bibliográficas

Appel MJG. 1987. Canine distemper virus. *En* Appel MJG (ed): Virus Infections of Carnivores.

Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Holanda: 133-159.

Appel MJG, Summers BA. 1995. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores.

Veterinary Microbiology, 44: 187-191.

Blair EM, Chambers MA, King HA. 1998. Treating distemper in a young ferret. *Veterinary*

Medicine, 93: 655-658.

- Carpenter JW, Appel MJG, Erickson RC, Novilla MN. 1976. Fatal vaccine-induced canine distemper virus infection in black footed ferrets. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 169: 961-964.
- Davidson M. 1986. Canine distemper virus infection in the domestic ferret. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 8: 448-453.
- Evermann JF, Leathers CW, Gorham JR, McKeirnan AJ, Appel MJG. 2001. Pathogenesis of two strains of lion (*Panthera leo*) morbillivirus in ferrets (*Mustela putorius furo*). *Veterinary Pathology*, 38: 311-316.
- Fox JG, Pearson RC, Gorham JR. 1998. Viral diseases. *En* Fox JG (ed): *Biology and Diseases of the Ferret*. 2a ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, Estados Unidos: 355-374.
- Gill JM, Hartley WJ, Hodgkinson NL. 1988. An outbreak of post-vaccinal suspected distemper-like encephalitis in farmed ferrets (*Mustela putorius furo*). *New Zealand Veterinary Journal*, 36: 173-176.
- Greene CE, Appel MJ. 2006. Canine distemper. *En* Green CE (ed): *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3a ed. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, Estados Unidos: 25-41.
- Harbarth S, Sudre P, Dharan S, Cadenas M, Pittet D. 1999. Outbreak of *Enterobacter cloacae* related to understaffing, overcrowding, and poor hygiene practices. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 20: 598-603.

Kauffman CA, Bergman AG, Oconnor RP. 1982. Distemper virus infection in ferrets - an animal model of measles-induced immunosuppression. *Clinical and Experimental Immunology*, 47: 617-625.

Liberson AJ, Newcomer CE, Ackerman JI, Murphy JC, Fox JG. 1983. Mastitis caused by hemolytic *Escherichia coli* in the ferret. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 183: 1179-1181.

Marini RP, Taylor NS, Liang AY, Knox KA, Peña JA, Schauer DB, Fox JG. 2004. Characterization of hemolytic *Escherichia coli* strains in ferrets: recognition of candidate virulence factor CNF1. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 5904-5908.

Porter DD, Larsen AE, Cox NA. 1975. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from Mustelidae. *Journal of Clinical Microbiology*, 1: 112-113.

Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby, Edinburgo, Escocia, Reino Unidos.

Rosenthal KL. 2004. Respiratory diseases. *En* Quesenberry KE, Carpenter JW (eds): *Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*. 2a ed. Saunders, St. Louis, Estados Unidos: 72-78.

Stephensen CB, Welter J, Thaker SR, Taylor J, Tartaglia J, Paoletti E. 1997. Canine distemper virus (CDV) infection of ferrets as a model for testing Morbillivirus vaccine strategies: NYVAC- and ALVAC-based CDV recombinants protect against symptomatic infection. *Journal of Virology*, 71: 1506-1513.

von Messling V, Springfield C, Devaux P, Cattaneo R. 2003. A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *Journal of Virology*, 77: 12579-12591.

Welter J, Taylor J, Tartaglia J, Paoletti E, Stephensen CB. 2000. Vaccination against canine distemper virus infection in infant ferrets with and without maternal antibody protection, using recombinant attenuated poxvirus vaccines. *Journal of Virology*, 74: 6358-6367.

Williams ES, Thorne ET, Appel MJG, Belitsky DW. 1988. Canine distemper in black footed ferrets (*Mustela nigripes*) from Wyoming. *Journal of Wildlife Diseases*, 24: 385-398.

Wimsatt J, Jay MT, Innes KE, Jessen MJ, Collins JK. 2001. Serologic evaluation, efficacy, and safety of a commercial modified-live canine distemper vaccine in domestic ferrets. *American Journal of Veterinary Research*, 62: 736-740.

5. DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD POR CORONAVIRUS SISTÉMICO EN HURONES

5.1. Introducción

En el año 2004 se empezó a observar en España una enfermedad hasta entonces desconocida que afectaba a los hurones domésticos y que presentaba lesiones microscópicas similares a las descritas en la peritonitis infecciosa felina (PIF). Las lesiones histopatológicas y los resultados inmunohistoquímicos frente a coronavirus se describen en el capítulo 6 de esta tesis. En este capítulo se presentarán las características clínicas de la enfermedad así como información sobre su epidemiología, signos clínicos, resultados laboratoriales, tratamiento y mortalidad.

5.2. Material y métodos

El estudio incluyó nueve animales (cinco hembras y cuatro machos) que desarrollaron la enfermedad y fueron diagnosticados y tratados por el autor de esta tesis. La mayoría de los pacientes se habían comprado en tiendas de animales (8/9) y provenían de Nueva Zelanda (3/9), Holanda (1/9) y España (1/9); si bien, de cuatro hurones no pudo obtenerse información sobre su un origen (Tabla 5.1).

La historia previa a la fecha de adquisición de los hurones por parte de los propietarios finales fue muy escasa, si bien, se constató el hecho de que algunos hurones se habían mantenido en una granja con posible contacto con otras especies (como perros, gatos, conejos, roedores, aves y reptiles) hasta el día de su venta a las tiendas de animales. Los hurones se adquirieron finalmente por propietarios de la ciudad de Barcelona, se alimentaron con una dieta seca para hurón y tuvieron poco o ningún acceso al exterior de las viviendas. Seis hurones afectados vivían con otros hurones y uno vivía conjuntamente con otros hurones y gatos. Tres hurones se vacunaron de mo-

quillo con vacuna atenuada de origen aviar durante el primer mes en casa de los propietarios finales.

Los hurones 1 y 4 nacieron en 2003 (antes de que se detectaran los primeros casos) y murieron tras la introducción y muerte de compañeros más jóvenes (Tabla 5.1.). El hurón 4 empezó a mostrar signos clínicos tres meses después de la muerte de su nuevo compañero (hurón 3 en el estudio). El hurón 1 presentó signos clínicos cinco meses después de la introducción de un nuevo compañero más joven y murió cuatro meses más tarde; su compañero enfermó y murió alrededor de la misma fecha, con signos clínicos y hallazgos clinicopatológicos compatibles con la enfermedad por coronavirus sistémico, pero en este individuo no se pudo realizar necropsia ni histopatología.

Los signos clínicos aparecieron entre los 1,25 y los 8,75 meses de edad (mediana = 4,25 meses) y entre los 0 y los 4,75 meses tras la compra final (mediana = 0,75 meses). Los hurones 1 y 4 se consideraron *outliers* y no se incluyeron en estos cálculos.

Hurón	Sexo	Origen	Nacimiento	Compra por el propietario final	Inicio de los signos clínicos	Muerte
1	♀	España	01/06/2003	01/10/2003	10/10/2004	03/02/2005
2	♂	Desconocido	22/07/2004	15/10/2004	08/11/2004	23/11/2004
3	♂	Nueva Zelanda	14/07/2004	18/09/2004	11/02/2005	07/03/2005
4	♂	Nueva Zelanda	01/04/2003	10/09/2003	03/06/2005	04/07/2005
5	♀	Nueva Zelanda	01/09/2004	15/01/2005	25/05/2005	20/09/2005
6	♂	Holanda	15/02/2005	21/03/2005	21/03/2005	29/08/2005
7	♀	Desconocido	01/09/2004	01/11/2004	02/12/2004	07/06/2005
8	♀	Desconocido	13/04/2005	20/08/2005	20/08/2005	18/10/2005
9	♀	Desconocido	03/01/2006	*	29/06/2006	27/07/2006

Tabla 5.1. Historia de los nueve hurones diagnosticados con enfermedad por coronavirus sistémico.

* Este hurón se diagnosticó mientras estaba en una tienda de animales y no fue adquirido posteriormente.

5.3. Resultados

5.3.1. Signos clínicos

La mayoría de hurones (7/9) mostraron diarrea marrón o amarillo-verdosa como primer signo clínico. Se encontraron parásitos (*Giardia*, coccidios) en dos de estos hurones, pero el tratamiento específico no resolvió la diarrea, aunque la carga parasitaria desapareció. A lo largo del curso de la enfermedad, la diarrea progresó de marrón a amarillo-verdosa y finalmente a verdosa o hemorrágica. Los primeros signos observados en seis animales consistieron en letargo, hiporexia/anorexia, pérdida de peso o incapacidad para ganar peso en animales en crecimiento.

Los otros tres hurones presentaron también los mismos signos de forma más tardía. La debilidad progresiva del tercio posterior se observó en seis animales, tanto como un signo temprano como tardío. En dos animales las convulsiones y los temblores precedieron la muerte. Otros signos menos frecuentes fueron tos (3/9), vómito (2/9), ictericia (1/9) y áreas focales de eritema (1/9). En todos los animales se observaron mejorías intermitentes durante el curso de la enfermedad.

5.3.2. Hallazgos clinicopatológicos

En todos los casos se observó que el peso corporal estaba por debajo de lo considerado como normal y se detectaron anomalías en la palpación abdominal. Se detectaron masas abdominales en los nueve hurones (Fig. 5A). Posteriormente, y mediante laparotomía exploratoria, radiografía o necropsia se observó que estas masas se correspondían con linfonodos mesentéricos hiperplásicos (9/9) (Fig. 5B), esplenomegalia (8/9) (Fig. 5C) y nefromegalia (3/9). La superficie de estos órganos, particularmente los riñones y los linfonodos mesentéricos, era irregular en algunos casos. El aumento de la temperatura rectal (>40°C) sólo se observó en tres animales. Los cambios

hematológicos fueron variables e inespecíficos, e incluyeron anemia no regenerativa (4/7), leucocitosis neutrofílica (2/7) y linfopenia (3/7).

Serológicamente, en todos los hurones se detectó una hiperglobulinemia con gammapatía policlonal, con una hiperproteinemia concurrente en cuatro hurones. Los niveles de globulinas fueron superiores a 4,2 g/dL y representaron el 77,2-88,9% (mediana = 79,9%) del total de proteínas plasmáticas (Fig. 5D). Además, las γ -globulinas fueron mayores de 1,8 g/dL y representaron el 35,5-60,9% (mediana = 43,6%) del total de proteínas. La relación albúmina:globulina fue baja en todos los casos (0,13-0,29, mediana = 0,26). También se detectaron aumentos moderados de globulinas α y β .

Otros parámetros bioquímicos (Aspartato Aminotransferasa [AST], Fosfatasa Alcalina [AP], Nitrógeno Uréico [BUN], creatinina, glucosa, colesterol, calcio y fósforo) mostraron valores considerados como normales en todos los hurones analizados (5/5). No se detectaron anticuerpos de la enfermedad aleutiana en los hurones analizados (6/6) (Quickchek® ADV, Avecon Diagnostics, Bath, PA, Estados Unidos). Se tomaron radiografías de cuatro animales, que presentaron ascitis (1/4), esplenomegalia (3/4) y nefromegalia (2/4). En uno de estos animales se realizó un estudio radiográfico con contraste que indentificó una masa abdominal desplazando los intestinos (Fig. 5E).

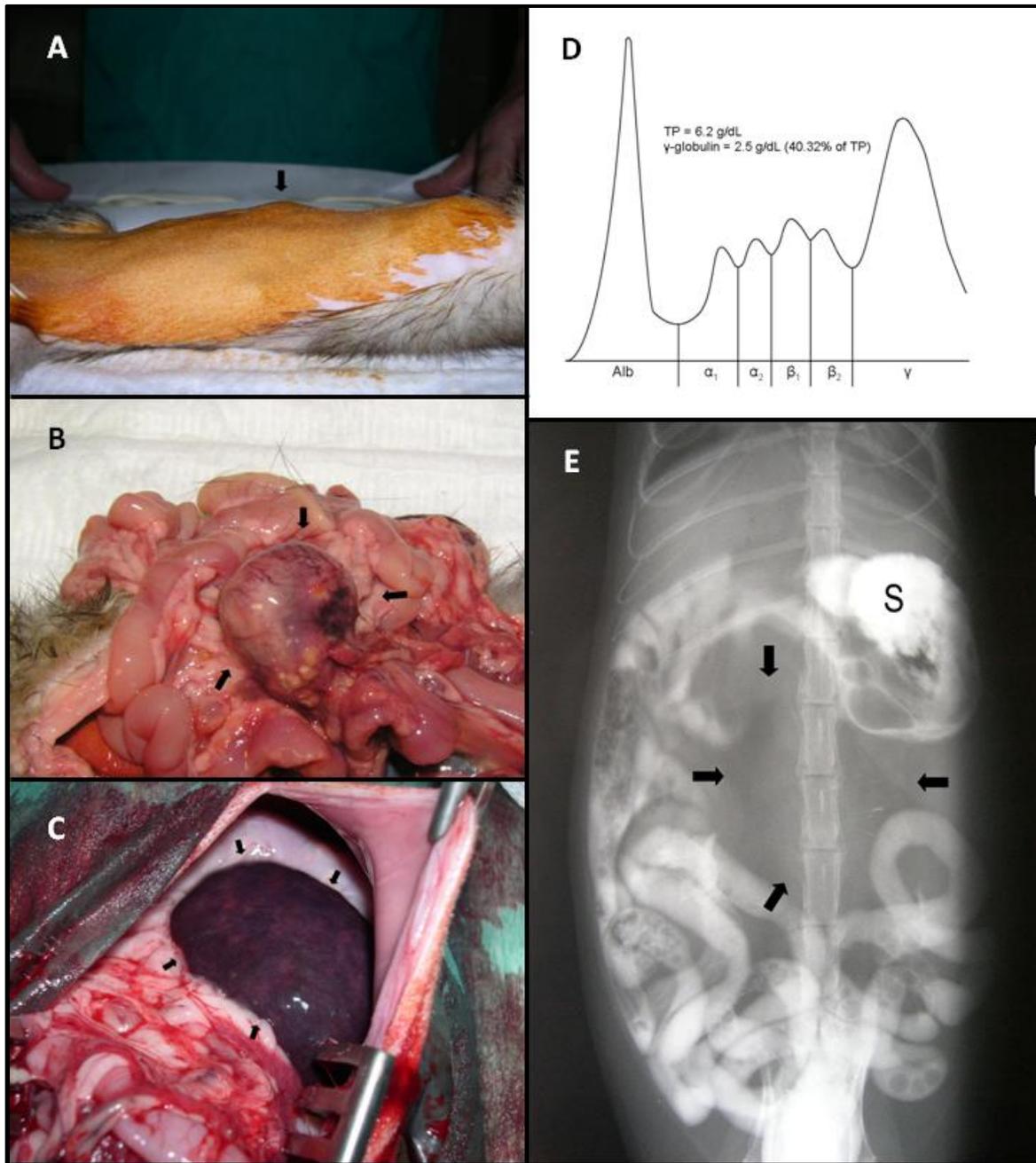


Figura 5. Hallazgos en hurones diagnosticados con enfermedad sistémica por coronavirus.

A. Linfadenomegalia mesentérica (flecha) en el hurón 9 antes de la laparotomía exploratoria y la biopsia. B. Linfadenomegalia mesentérica (flechas) en el hurón 6. C. Esplenomegalia (flechas) en el hurón 9. D. Hipergammaglobulinemia policlonal en el hurón 8. También se observan aumentos en las globulinas α y β . E. Radiografía de contraste en el hurón 5. El espacio en el abdomen sin asas intestinales (flechas) estaba ocupado por un linfonodo aumentado de tamaño. S: estómago

5.3.3. Tratamiento y desenlace

Dependiendo de los signos clínicos y de los hallazgos clinicopatológicos, el enfoque terapéutico varió e incluyó glucocorticoides, esteroides anabolizantes, antibióticos, antiprotozoarios, antiinflamatorios no esteroideos, fármacos citotóxicos y soporte nutricional. Algunos animales mejoraron, de forma subjetiva y transitoria, con el tratamiento durante algunas semanas o meses, pero su condición corporal finalmente se deterioró y todos los animales murieron o fueron sacrificados.

Se realizó una esplenectomía en unos de los hurones con esplenomegalia y en dos animales se realizaron laparotomías y biopsias de los linfonodos mesentéricos. El hurón de la esplenectomía (hurón 1) sobrevivió tres meses tras la cirugía. Las biopsias de linfonodos mesentéricos (hurones 2 y 9) fueron positivas para enfermedad granulomatosa y los hurones se sacrificaron una semana después del procedimiento quirúrgico. En los hurones en los que no se realizó ningún procedimiento quirúrgico, el tiempo entre el inicio de signos clínicos y la muerte fue de uno a seis meses (mediana = 3 meses).

5.4. Discusión

Martínez *et al.* describieron en 2006 una nueva enfermedad en hurones con lesiones histopatológicas similares a las observadas en gatos con PIF; estos hurones fueron positivos a antígeno de coronavirus grupo I mediante detección inmunohistoquímica. A la enfermedad se le denominó síndrome inflamatorio granulomatoso (Granulomatous Inflammatory Syndrome: GIS) de los hurones, aunque otros trabajos sugirieron el término Ferret Systemic Coronaviral Disease (FSCVD) (Garner *et al.*, 2008).

La información proporcionada por el presente estudio ha sido muy útil para los veterinarios que trabajan con hurones al facilitar el diagnóstico y el pronóstico adecuados de esta enfermedad. Nuestro trabajo demuestra la presencia de diarrea como primer signo clínico en los hurones con FSCVD. Igualmente, muestra que los animales afectados suelen ser hurones jóvenes adquiridos en las semanas o meses previos al desarrollo de la enfermedad, y que la presencia de linfadenopatía mesentérica y de hipergammaglobulinemia policlonal es característico e indicativo de esta enfermedad.

En la mayoría de los casos también se encontró esplenomegalia y debilidad del tercio posterior, aunque éstos son signos inespecíficos frecuentes en muchas otras enfermedades de hurones (Antinoff, 2004; Petrie y Morrisey, 2004; Welchman *et al.*, 1993). Además, la incomodidad causada por la esplenomegalia o la linfadenomegalia puede reflejarse en la debilidad del tercio posterior (Antinoff, 2004).

La fiebre, la anemia y la linfopenia se encontraron de forma inconsistente en hurones con FSCVD, lo que se ha observado también en gatos con PIF (De Groot-Mijnes *et al.*, 2005; McReynolds y Macy, 1997; Pedersen, 1995). Otros signos clínicos (como convulsiones, ictericia y tos) podrían depender de la formación de granulomas en determinados órganos (Addie y Jarrett, 2006; McReynolds y Macy, 1997). Unos de los hurones afectados mostró ascitis, aunque las lesiones histopatológicas y el análisis del líquido presente en la cavidad abdominal fueron similares a lo observado en la PIF seca de los gatos; es probable que la ascitis fuera secundaria a la formación de granulomas en órganos parenquimatosos. Además, en ocasiones se observa la presencia de exudados en las cavidades corporales de gatos con PIF seca (Weiss, 1994).

El diagnóstico diferencial de los hurones con linfadenopatía mesentérica e hipergammaglobulinemia incluye linfoma y enfermedad aleutiana. En la enfermedad aleutiana no siempre se observa hipergammaglobulinemia y linfadenopatía (Petrie y Morrisey, 2004; Porter *et al.*, 1982; Une *et al.*, 2000; Welchman *et al.*, 1993) y, cuando están presentes, generalmente son menos marcadas que en los casos observados de FSCVD (Fox *et al.*, 1998; Petrie y Morrisey, 2004; Porter *et al.*, 1982; Welchman *et al.*, 1993). A diferencia de los casos de FSCVD referenciados aquí, en la enfermedad aleutiana en hurones la gammopatía es monoclonal (Fox *et al.*, 1998; Palley *et al.*, 1992) y la diarrea no es frecuente (Fox *et al.*, 1998; Petrie y Morrisey, 2004).

Otras pruebas para detectar enfermedad aleutiana son la serología y la histología (Petrie y Morrisey, 2004; Porter *et al.*, 1982), aunque la PCR y la hibridación *in situ* también se pueden realizar. El linfoma puede producir lesiones macroscópicas idénticas a la FSCVD, pero es muy raro encontrar hipergammaglobulinemia asociada a esta neoplasia (Ammersbach *et al.*, 2008; Erdman *et al.*, 1998). En algunos casos de linfoma se ha observado linfocitosis y linfocitos circulantes anómalos (Ammersbach *et al.*, 2008; Erdman *et al.*, 1998; Williams y Weiss, 2004), pero esto no se ha observado en hurones con FSCVD.

Se utilizó la histopatología y las técnicas inmunohistoquímicas para diagnosticar FSCVD en estos hurones; sin embargo, se puede realizar un diagnóstico presuntivo inicial basado en la historia, los signos clínicos y los hallazgos clinicopatológicos. El análisis histopatológico de las biopsias de los linfonodos mesentéricos obtenidas mediante laparotomía exploratoria fue una opción diagnóstica en animales vivos. Se debe considerar el uso futuro de otras opciones diagnósticas utilizadas en gatos con PIF, como la serología y/o la PCR.

El tratamiento fue ineficaz en todos los casos. Sin embargo, esta afirmación podría estar sesgada por el hecho de que el diagnóstico de la enfermedad fue por necropsia e histopatología en la mayoría de casos (es decir, que los animales afectados que se podrían haber recuperado de la enfermedad no se habrían diagnosticado definitivamente y, por tanto, no se habrían incluido en este estudio).

Además, el tratamiento no fue idéntico en todos los animales, aunque siempre incluyó corticosteroides y un tratamiento sintomático y de soporte. El tratamiento y la prevención de FSCVD en hurones deberían seguir las mismas pautas que en la PIF felina. Por último, las recuperaciones temporales observadas durante el tratamiento podrían no estar relacionadas con la eficacia de la terapia y podrían ser el resultado del curso normal de la enfermedad, tal como ocurre en la PIF felina (De Groot-Mijnes *et al.*, 2005).

La mayoría de hurones incluidos en este estudio fueron animales jóvenes que se habían importado de otros países. Estos hurones fueron destetados, esterilizados quirúrgicamente, identificados mediante microchip y vacunados contra la rabia cuando tenían menos de 2 meses de edad. Entonces eran enviados a otros países, donde se mantenían en granjas o instalaciones con una elevada densidad de población y se repartían a las tiendas de animales, donde eran adquiridos por el propietario final. En estas condiciones, es muy posible generar un estado de inmunosupresión por estrés y, por tanto, generar una mayor susceptibilidad a las enfermedades infecciosas.

Tal como se ha referenciado científicamente, la inmunosupresión facilita el desarrollo de PIF en gatos (Addie y Jarrett, 2006; De Groot-Mijnes *et al.*, 2005), y es muy posible que una situación similar ocurra en hurones con FSCVD. Además, se ha descrito que la PIF es una enfermedad que afecta principalmente a gatos jóvenes que se crían en ambientes con muchos gatos, como por

ejemplo centros de acogida, lo que favorece la transmisión oro-fecal del coronavirus (Pedersen, 1995); esta situación se detectó en los hurones afectados por FSCVD.

Tal como se ha referenciado en la PIF (Pedersen, 1995), FSCVD podría ser una nueva enfermedad o bien podría haber pasado desapercibida y se habría introducido recientemente en las poblaciones de animales domésticos, mediada por algunos cambios en el actual manejo de los hurones que podrían haber favorecido la infección y la enfermedad.

Trabajos más recientes han demostrado que el FSCV está más relacionado con el FECV que con otros coronavirus del grupo 1 (Wise *et al.*, 2010). En cualquier caso, parece claro que los primeros casos de FSCVD comenzaron a detectarse en 2003, algo que también observaron Garner *et al.* (2008). Los resultados del presente estudio indican que la aparición o diseminación de FSCVD ha podido estar asociada a situaciones de estrés, mala higiene y el auge comercial de estos animales como mascotas.

La epidemiología de FSCVD también sigue patrones similares a PIF, con brotes epizoóticos cuando aparece por primera vez, seguido de periodos en los que la enfermedad se comporta de forma enzoótica con escasa mortalidad (Pedersen, 1995). De hecho, en el presente trabajo se confirmaron ocho casos (más algunos probables) durante 2005, pero solo uno durante 2006. La infección entre hurones en las granjas antes de la compra por el propietario final parece muy probable.

5.5. Referencias bibliográficas

- Addie DD, Jarrett O. 2006. Feline coronavirus infections. *En* Greene CE (ed): Infectious Diseases of the Dog and Cat. 3a ed. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, Estados Unidos: 88-102.
- Ammersbach M, DeLay J, Caswell JL, Smith DA, Taylor WM, Bienzle D. 2008. Laboratory findings, histopathology, and immunophenotype of lymphoma in domestic ferrets. *Veterinary Pathology*, 45: 663-673.
- Antinoff N. 2004. Musculoskeletal and neurologic diseases. *En* Quesenberry KE, Carpenter JW (eds): Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery. 2a ed. W. B. Saunders, St. Louis, Missouri, Estados Unidos: 115-120.
- De Groot-Mijnes JDF, van Dun JM, van der Most RG, de Groot RJ. 2005. Natural history of a recurrent feline coronavirus infection and the role of cellular immunity in survival and disease. *Journal of Virology*, 79: 1036-1044.
- Erdman SE, Li X, Fox JG. 1998. Hematopoietic diseases. *En* Fox JG (ed): Biology and Diseases of the Ferret. 2a ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, Estados Unidos: 231-246.
- Fox JG, Pearson RC, Gorham JR. 1998. Viral diseases. *En* Fox JG (ed): Biology and Diseases of the Ferret. 2a ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, Estados Unidos: 355-374.
- Garner MM, Ramsell K, Morera N, Juan-Sallés C, Jiménez J, Ardiaca M, Montesinos A, Teifke JP, Löhr CV, Evermann JF, Baszler TV, Nordhausen RW, Wise AG, Maes RK, Kiupel M. 2008. Clinicopathologic features of a systemic coronavirus-associated disease resem-

- bling feline infectious peritonitis in the domestic ferret (*Mustela putorius*). *Veterinary Pathology*, 45: 236-246.
- Martínez J, Ramis AJ, Reinacher M, Perpiñán D. 2006. Detection of feline infectious peritonitis virus-like antigen in ferrets. *Veterinary Record*, 158: 523.
- McReynolds C, Macy D. 1997. Feline infectious peritonitis.1. Etiology and diagnosis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 19: 1007-1016.
- Palley LS, Corning BF, Fox JG, Murphy JC, Gould DH. 1992. Parvovirus-associated syndrome (Aleutian disease) in 2 ferrets. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 201: 100-106.
- Pedersen NC. 1995. An overview of feline enteric coronavirus and infectious peritonitis virus-infections. *Feline Practice*, 23: 7-20.
- Petrie JP, Morrisey JK. 2004. Cardiovascular and other diseases. *En Quesenberry KE, Carpenter JW (eds): Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*. 2a ed. W. B. Saunders, St. Louis, Missouri, Estados Unidos: 58-71.
- Porter HG, Porter DD, Larsen AE. 1982. Aleutian disease in ferrets. *Infection and Immunity*, 36: 379-386.
- Une Y, Wakimoto Y, Nakano Y, Konishi M, Nomura Y. 2000. Spontaneous Aleutian disease in a ferret. *Journal of Veterinary Medical Science*, 62: 553-555.
- Weiss RC. 1994. Feline infectious peritonitis and other coronaviruses. *En Sherding RG (ed): The Cat: Diseases and Clinical Management*. W. B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, Estados Unidos: 447-449.

Welchman DD, Oxenham M, Done SH. 1993. Aleutian disease in domestic ferrets - diagnostic findings and survey results. *Veterinary Record*, 132: 479-484.

Williams BH, Weiss CA. 2004. Neoplasia. *En* Quesenberry KE, Carpenter JW (eds): *Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*. 2a ed. Saunders, St. Louis, Missouri, Estados Unidos: 91-106.

Wise AG, Kiupel M, Garner MM, Clark AK, Maes RK. 2010. Comparative sequence analysis of the distal one-third of the genomes of a systemic and an enteric ferret coronavirus. *Virus Research*, 149: 42-50.

6. IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENO DE CORONAVIRUS TIPO 1 EN LAS LESIONES HISTOLÓGICAS DE LA ENFERMEDAD SISTÉMICA POR CORONAVIRUS EN HURONES

6.1. Introducción

Tras la descripción de la enfermedad por coronavirus sistémico en hurones y su caracterización clínica y epidemiológica se investigaron las características lesionales y la detección antigénica del virus mediante técnicas inmunohistoquímicas en animales con esta enfermedad.

6.2. Material y métodos

6.2.1. Muestras

Se obtuvieron tejidos incluidos en parafina de nueve hurones (hurones 1-9) que murieron por enfermedad sistémica por coronavirus entre 2004 y 2005. Estas muestras estaban depositadas en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. Las muestras para el desarrollo de este trabajo fueron riñón ($n=8$), bazo (7), pulmón (6), linfonodo (5), intestino (5), hígado (5), corazón (4), páncreas (2) y glándula adrenal (1) (Tabla 6.1).

6.2.2. Histopatología

Los bloques de parafina se cortaron en láminas tisulares de 4 μm de grosor y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) después de desparafinar. Las lesiones histológicas granulomatosas se clasificaron siguiendo la propuesta de Kipar *et al.* (1998a), con una pequeña modificación, que fue la inclusión de una nueva categoría lesional (granuloma con neutrófilos), tal como se descri-

be más adelante. Se obtuvieron cortes adicionales que se tiñeron con las tinciones histoquímicas de Ziehl–Neelsen, ácido peryódico de Schiff (PAS) y Warthin–Starry para descartar agentes etiológicos como *Mycobacterium*, otras bacterias (como *Helicobacter* spp.) y organismos fúngicos.

6.2.3. Inmunohistoquímica (IHC)

Para la detección inmunohistoquímica de antígeno del coronavirus felino (FCoV) se utilizó el anticuerpo monoclonal FCV3-70 (Custom Monoclonal Internationals, West Sacramento, California, Estados Unidos) empleando el método de la peroxidasa-antiperoxidasa descrito por Kipar *et al.* (1998a); se incluyeron controles positivos y negativos.

6.3. Resultados

6.3.1. Observaciones clínicas

La población de hurones incluida en el estudio fueron cinco machos y cuatro hembras, con una edad de 4–24 meses. Todos se mantuvieron como mascotas sin acceso al exterior de las viviendas. Un hurón estaba en contacto con gatos y otros cuatro se mantenían con otros hurones. Los signos clínicos se detallaron en el capítulo 5 de esta tesis doctoral y consistieron en diarrea, debilidad del tercio posterior, anorexia y pérdida de peso. También mostraron linfadenomegalia, esplenomegalia, anemia e hipergammaglobulinemia. La serología realizada para detectar anticuerpo contra el virus de la enfermedad aleutiana (Quickchek[®] ADV, Avecon Diagnostics, Pennsylvania, Estados Unidos) fue negativa en todos los casos. El tratamiento con corticosteroides, antibióticos y medidas de soporte no fue eficaz y todos los animales finalmente murieron o fue-

ron sacrificados. Las necropsias fueron realizadas por veterinarios clínicos que enviaron las muestras de tejidos fijadas en formol al laboratorio.

6.3.2. Hallazgos inmunohistoquímicos e histopatológicos

En varios tejidos de ocho de los nueve hurones analizados se detectó antígeno de coronavirus mediante inmunohistoquímica. La inmunotinción positiva consistió en un precipitado citoplasmático granular en macrófagos localizados en las lesiones granulomatosas. La distribución y el número de tejidos positivos fueron los siguientes: linfonodo (4 animales), riñón (2), bazo (2), pulmón (2), hígado (2), páncreas (2), intestino (1), corazón (1) y glándula adrenal (1) (Tabla 6.1).

Las lesiones granulomatosas detectadas en ocho animales y positivas inmunohistoquímicamente frente al virus se clasificaron atendiendo a sus componentes celulares y a distribución; así las lesiones se clasificaron en: inflamación granulomatosa difusa en las serosas, granulomas con áreas de necrosis, granulomas sin necrosis y granulomas con neutrófilos (piogranulomas).

La inflamación granulomatosa difusa en serosas orgánicas se observó principalmente en linfonodos (5 animales), intestino (3) y ocasionalmente en riñón (1) y corazón (1). El infiltrado inflamatorio, de moderado a abundante, estaba compuesto principalmente por macrófagos y escasas células linfoplasmocitarias asociadas a la destrucción de las células endoteliales y del tejido adiposo adyacente. En algunos casos, las superficies serosas estaban cubiertas por capas de exudado precipitado que contenían numerosos granulomas pequeños.

Hurón	Riñón	Bazo	Pulmón	Nódulo linfático	Intestino	Hígado	Corazón	Páncreas	Glándula adrenal
1	-	-	-	+	-	N	N	N	N
2	-	N	N	+	N	N	N	N	N
3	+	N	N	N	N	N	N	N	+
4	-	-	-	-	-	-	-	N	N
5	-	-	+	N	-	+	+	N	N
6	-	+	-	+	+	+	N	N	N
7	+	-	+	+	N	-	-	+	N
8	-	-	-	-	-	-	-	+	N
9	N	+	N	N	N	N	N	N	N

Tabla 6.1. Análisis inmunohistoquímico de los tejidos examinados en nueve hurones afectados por enfermedad sistémica por coronavirus.

+: positivo

-: negativo

N: sin tejido disponible

En los linfonodos, este exudado se asociaba con frecuencia a la proliferación fibroblástica; en el intestino, las fibras musculares subyacentes y la submucosa estaban afectadas en algunas muestras. En el corazón los infiltrados se extendían de forma difusa ocupando grandes áreas del miocardio. El antígeno de coronavirus se observó en la mayoría de las lesiones en un pequeño número de macrófagos.

Los granulomas con áreas de necrosis se encontraron restringidos principalmente a la serosa y al parénquima de los linfonodos (4 animales). En un caso este tipo de granuloma se encontró en el parénquima pancreático, con una gran área de necrosis central rodeada de un pequeño borde de macrófagos y una fina capa de células linfoplasmáticas. En dos linfonodos (hurones 2 y 6) se observaron áreas de necrosis licuefactiva acompañada de pequeños acúmulos de cristales de colesterol y macrófagos espumosos (Fig. 6.1). Se detectó antígeno viral en la mayoría de los casos en un pequeño número de macrófagos.

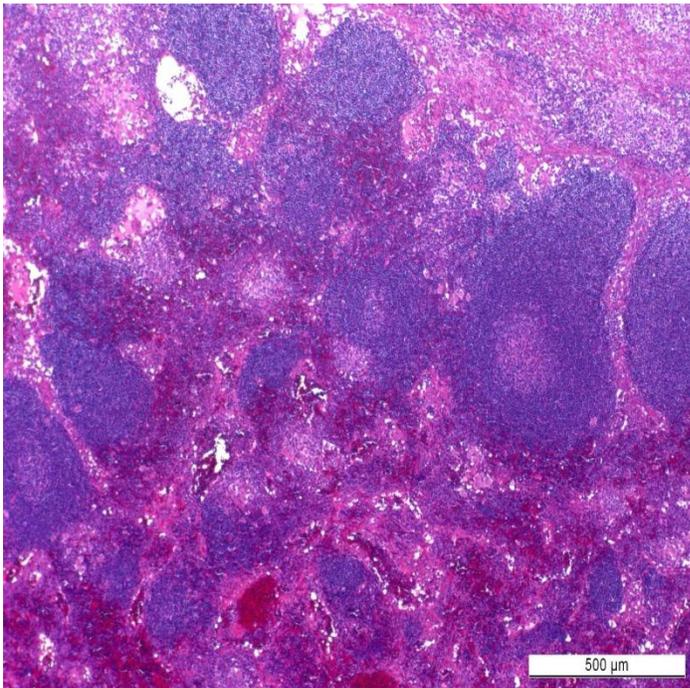
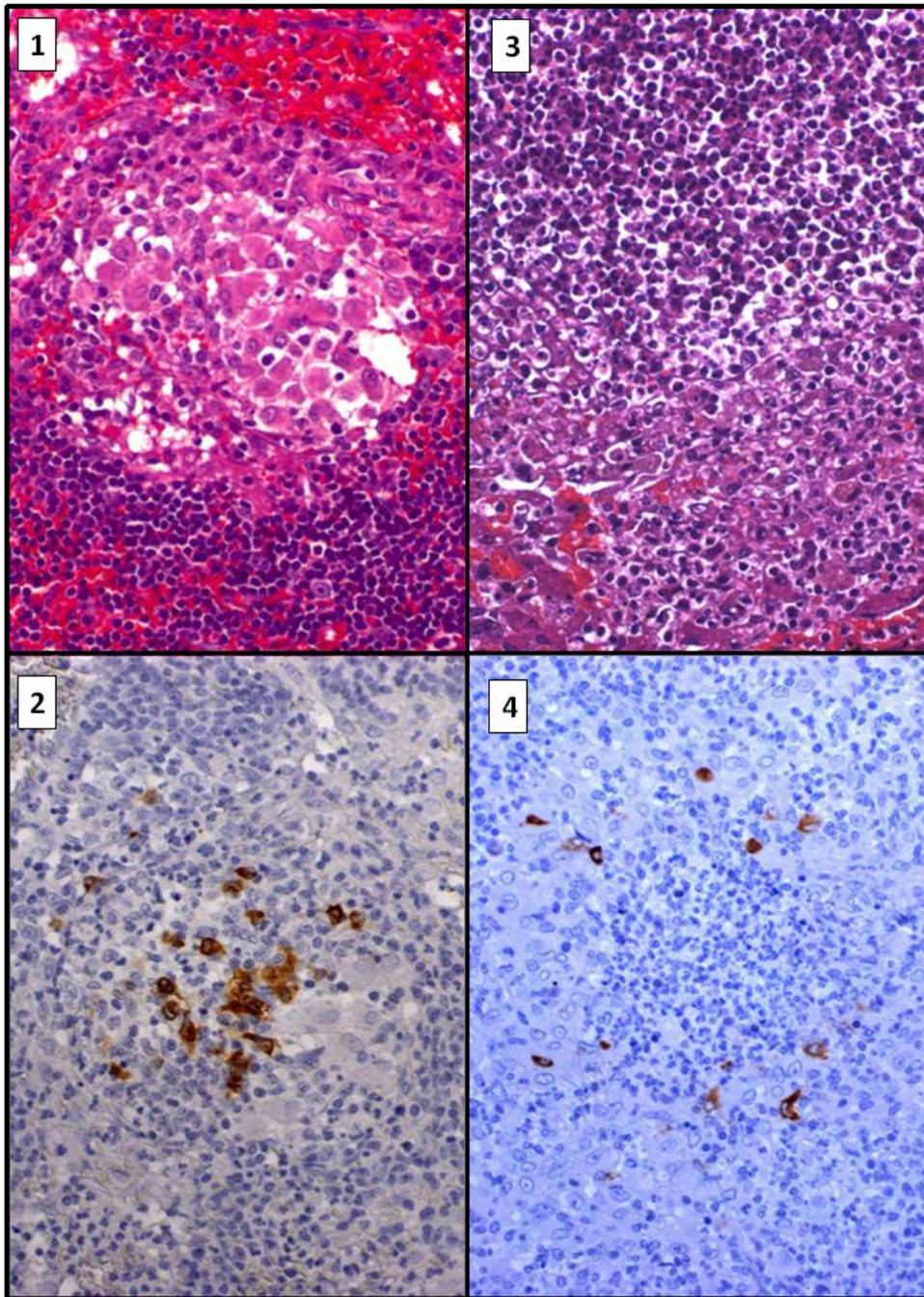


Figura 6.1. Áreas multifocales de necrosis en un linfonodo mesentérico de un hurón afectado por enfermedad por coronavirus sistémico. Hematoxilina y eosina, $\times 40$.

Los granulomas sin necrosis se observaron en el bazo (3 animales), linfonodos (2), pulmón (1), páncreas (1), placas de Peyer (1) y omento (1). Estos granulomas eran pequeños y con un centro de macrófagos rodeado de numerosas células linfoplasmocitarias (Fig. 6.2.1). Se observaron acúmulos focales y moderados de tejido conjuntivo en tres muestras de bazo y una de pulmón. En el omento, algunos de estos granulomas se localizaban junto a los vasos sanguíneos. En la mayoría de granulomas, el antígeno viral se observó en un gran número de macrófagos (Fig. 6.2.2).

Los granulomas con neutrófilos se encontraron en varios órganos: riñón (2 animales), bazo (1), pulmón (1), linfonodo (1), hígado (1) y glándula adrenal (1). El centro de cada granuloma contenía un gran acúmulo de neutrófilos, rodeado por una gruesa capa de macrófagos y células linfoplasmocitarias (Fig. 6.2.3). En la corteza renal y en los pulmones los granulomas eran numerosos y confluentes. En la mayoría de las lesiones se observaron numerosos macrófagos positivos a la IHC (Fig. 6.2.4).

Se observaron otras lesiones menos frecuentes. Así, se detectó una vasculitis granulomatosa necrotizante en la serosa de un linfonodo con algunos macrófagos que contenían antígeno de coronavirus. Además, se detectaron infiltrados linfoplasmocitarios perivasculares en el omento del intestino, que fueron negativos a antígeno viral.



Figuras 6.2.1-6.2.4.

6.2.1. Linfonodo. Granuloma sin necrosis, con un centro compuesto por macrófagos rodeados por células linfoplasmocitarias. Hematoxilina y eosina. $\times 200$.

6.2.2. Algunos macrófagos muestran un marcado positivo para el antígeno de coronavirus, que consiste en un precipitado granular en el citoplasma. IHC. $\times 200$.

6.2.3. Bazo. Granuloma con neutrófilos. Gran acumulación de neutrófilos en el centro, rodeado por un borde ancho de macrófagos y células linfoplasmacíticas. Hematoxilina y eosina. $\times 200$.

6.2.4. Presencia moderada de antígeno de coronavirus en los macrófagos. IHC. $\times 200$.

Finalmente, junto con lesiones granulomatosas en distintos órganos, el pulmón mostró lesiones de neumonía lipídica endógena en dos hurones (hurones 1 y 5). Esta lesión varió entre leve, con una distribución subpleural multifocal, a grave, con una acumulación alveolar difusa de cristales de colesterol y macrófagos vacuolares conjuntamente con macrófagos normales, células linfoplasmocitarias y fibrosis. La tinción inmunohistoquímica positiva se detectó en un pequeño número de macrófagos en las lesiones del hurón 5.

No se detectó antígeno de coronavirus en ninguno de los tejidos del hurón 4. Sin embargo, las lesiones histológicas observadas en este animal fueron similares a las observadas en los otros ocho hurones, caracterizadas por granulomas pequeños sin necrosis en el bazo y una reacción granulomatosa difusa en la serosa de los linfonodos.

No se encontraron evidencias histológicas de otros patógenos empleando las técnicas histoquímicas de Ziehl–Neelsen, PAS o Warthin–Starry.

6.4. Discusión

El anticuerpo monoclonal FCV3-70 utilizado para detectar antígeno de coronavirus del grupo I y los criterios de clasificación de las lesiones granulomatosas fueron los mismos empleados previamente en gatos con PIF (Kipar *et al.*, 1998a). Ocho de los nueve hurones mostraron antígeno de coronavirus en al menos uno de los órganos examinados.

Las lesiones histológicas fueron muy similares a las descritas en gatos con PIF, aunque hubo tres características que merecieron un comentario:

(1) El número de neutrófilos asociados a las lesiones necrotizantes en gatos varía mucho dependiendo de los diferentes estudios (Berg *et al.*, 2005; Kipar *et al.*, 1998a), mientras que los neutró-

filos fueron siempre abundantes en los hurones del presente estudio donde se encontraron estas células. Como resultado de esta observación se estableció una categoría adicional a las descritas en gatos: los granulomas con neutrófilos (piogranulomas). Esto sugiere que los neutrófilos pueden tener un papel patogénico relevante en las lesiones encontradas en hurones.

(2) Se observó neumonía lipídica endógena (histiocitosis alveolar) en el pulmón de dos hurones, así como inflamación granulomatosa con necrosis y acumulación lipídica en los linfonodos de otros dos hurones. En tres de estos cuatro casos, la IHC mostró antígeno viral en los macrófagos de estas lesiones. A pesar del pequeño número de animales con estas lesiones, éstas podrían indicar que algunos hurones tienen una predisposición natural a desarrollar lesiones granulomatosas con acumulación de lípidos, lo que no tiene por qué estar asociado necesariamente a la infección por coronavirus. De esta forma, la neumonía lipídica endógena se ha relacionado con una respuesta inespecífica a un daño, en la que participarían factores inherentes a esta u otras especies (Dungworth, 1993).

(3) La vasculitis necrotizante granulomatosa se detectó con menos frecuencia que en gatos con PIF. Es posible, sin embargo, que debido a que las lesiones granulomatosas eran tan extensas y graves en los hurones, las estructuras vasculares afectadas no se pudieran detectar.

La distribución del antígeno frente a coronavirus del grupo I y el porcentaje de animales positivos al utilizar la IHC presentaron características muy similares a las descritas en gatos con PIF, particularmente en lo que respecta a los granulomas necróticos, que generalmente mostraron una extensa área de necrosis, mientras que el antígeno viral se restringía a unos pocos macrófagos. Posiblemente, los macrófagos negativos a la IHC contenían una cantidad muy pequeña de virus

no detectable por la técnica, o bien el número reducido de macrófagos en algunas lesiones reducía la probabilidad de detectar antígeno viral (Kipar *et al.*, 1998a).

Se debe resaltar que, al igual que ocurre en gatos con PIF, los diferentes tipos de lesiones y la detección de antígeno viral varían dentro del mismo animal e incluso dentro del mismo órgano. Se ha sugerido que el responsable de esta variación pueden ser los episodios recurrentes de viremia asociada a los monocitos con desarrollo de nuevas lesiones en cada fase virémica (Kipar *et al.*, 2005). Esta hipótesis puede explicar los resultados negativos a la IHC en el hurón 4, en el cual se encontraron lesiones compatibles por la infección por coronavirus sistémico. En la opinión de este autor, debido a que probablemente este animal había sufrido episodios previos de viremia por coronavirus, la cantidad de virus presente era mínima en las fases finales de la enfermedad, cuando el animal fue sacrificado. Los estudios con PIF en gatos sugieren la necesidad de un examen más exhaustivo de tejido granulomatoso infectado para poder encontrar un mayor número de macrófagos inmunopositivos. En gatos con PIF se ha demostrado antígeno de coronavirus mediante inmunofluorescencia e IHC (Pedersen y Boyle, 1980; Tammer *et al.*, 1995). En el presente estudio, el anticuerpo utilizado en la IHC fue el FCV3-70, que reacciona con coronavirus felino, canino, porcino y de hurones (Kipar *et al.*, 1998a; Kipar *et al.*, 1998b; Williams *et al.*, 2000). No se conoce que los coronavirus canino y porcino produzcan lesiones granulomatosas en otras especies. El FECV produce enteritis catarral epizootica solamente en el hurón (Williams *et al.*, 2000; Wise *et al.*, 2006). Por lo tanto, parece que sólo hay tres posibles explicaciones a la presencia de antígeno de coronavirus en las lesiones granulomatosas descritas en nuestro estudio: una infección por FCoV; una infección por una mutación del FECV (como se ha sugerido en el caso del FCoV en gatos); o una infección por un coronavirus desconocido. Los trabajos poste-

rios han mostrado que se trata de un coronavirus nuevo y diferente, aunque similar al FECV (Wise *et al.*, 2010).

6.5. Referencias bibliográficas

Berg AL, Ekman K, Belak S, Berg M. 2005. Cellular composition and interferon-gamma expression of the local inflammatory response in feline infectious peritonitis (FIP). *Veterinary Microbiology*, 111: 15-23.

Dungworth DL. 1993. The respiratory system. *En* Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N (eds): *Pathology of Domestic Animals*. 4a ed. Academic Press, Londres, Reino Unido: 539-698.

Kipar A, Bellmann S, Kremendahl J, Kohler K, Reinacher M. 1998a. Cellular composition, coronavirus antigen expression and production of specific antibodies in lesions in feline infectious peritonitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 65: 243-257.

Kipar A, Kremendahl J, Addie DD, Leukert W, Grant CK, Reinacher M. 1998b. Fatal enteritis associated with coronavirus infection in cats. *Journal of Comparative Pathology*, 119: 1-14.

Kipar A, May H, Menger S, Weber M, Leukert W, Reinacher M. 2005. Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis. *Veterinary Pathology*, 42: 321-330.

Pedersen NC, Boyle JF. 1980. Immunological phenomena in the effusive form of feline infectious peritonitis. *American Journal of Veterinary Research*, 41: 868-876.

- Tammer R, Evensen O, Lutz H, Reinacher M. 1995. Immunohistological demonstration of feline infectious peritonitis virus-antigen in paraffin-embedded tissues using feline ascites or murine monoclonal antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 49: 177-182.
- Williams BH, Kiupel M, West KH, Raymond JT, Grant CK, Glickman LT. 2000. Coronavirus-associated epizootic catarrhal enteritis in ferrets. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217: 526-530.
- Wise AG, Kiupel M, Garner MM, Clark AK, Maes RK. 2010. Comparative sequence analysis of the distal one-third of the genomes of a systemic and an enteric ferret coronavirus. *Virus Research*, 149: 42-50.
- Wise AG, Kiupel M, Maes RK. 2006. Molecular characterization of a novel coronavirus associated with epizootic catarrhal enteritis (ECE) in ferrets. *Virology*, 349: 164-174.

7. VALORACIÓN DE LESIONES, ANTICUERPOS Y ANTÍGENO DE ENFERMEDAD ALEUTIANA EN HURONES CLÍNICAMENTE SANOS

7.1. Introducción

La enfermedad aleutiana (AD) se ha investigado durante décadas en visones y hurones. En hurones, las infecciones experimentales han sido capaces de reproducir la enfermedad y causar mortalidad. La alta prevalencia de la infección en algunas áreas ha llevado a forzar medidas estrictas de detección de portadores para evitar la introducción de animales positivos en poblaciones libres. Sin embargo, la enfermedad se considera muy rara en la práctica clínica y en los servicios de patología especializados en animales exóticos. Este estudio se realizó para clarificar la relación entre infección, enfermedad y el uso de diferentes pruebas diagnósticas.

7.2. Material y métodos

7.2.1. Animales

Para este estudio se utilizaron 10 hurones adultos clínicamente sanos (animales 1-10). Estos hurones se habían utilizado como controles negativos (no infectados) en un trabajo sobre influenza. Durante estos experimentos previos, los hurones se mantuvieron en instalaciones del Departamento de Recursos Animales de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Georgia, bajo un protocolo aprobado por el Comité Institucional para el Uso y Mantenimiento de Animales de la misma universidad. El protocolo al final del estudio dictaba el sacrificio de los animales.

7.2.2. Anestesia, necropsia y toma de muestras

Los hurones se anestesiaron con isoflurano administrado mediante una máscara. Una vez que se había obtenido un plano quirúrgico de anestesia, se sacrificaron con una inyección intravenosa de cloruro potásico. A continuación se obtuvo una muestra de 3 ml de sangre de la vena cava craneal: 1 ml se colocó en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y los otros 2 ml se colocaron en tubos de heparina.

De cada hurón se obtuvo una muestra de saliva empleando un aplicador de algodón y se recogió una muestra de orina haciendo presión leve en la vejiga; ambas muestras se colocaron en contenedores estériles. Se realizaron las correspondientes necropsias, no más tarde de tres horas después de la muerte de los animales y se tomaron muestras de hígado, riñón, estómago e intestino delgado que se colocaron para su fijación en una solución tamponada de formol al 10%. De los hurones 6-10 también se congelaron muestras de hígado e intestino delgado a -20°C. Los tejidos fijados en formol se procesaron de forma rutinaria para histología (cortes de aproximadamente 5 µm teñidos con hematoxilina y eosina) y se evaluaron mediante microscopía óptica.

7.2.3. Evaluación histopatológica

Las secciones de los órganos se examinaron microscópicamente y se tomó nota de la gravedad y distribución de las lesiones compatibles con AD (infiltración linfoplasmocitaria. Los grados lesionales recibieron los valores siguientes: 0 = ausencia de lesiones significativas (histología normal); 1 = alteraciones tisulares mínimas; 2 = alteraciones tisulares leves; 3 = alteraciones tisulares moderadas; 4 = alteraciones tisulares graves. La distribución lesional recibió la denominación de: F = Focal; M = Multifocal; D = Difusa.

7.2.4. Serología, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación *in situ*

Las muestras de sangre, saliva y los órganos congelados se enviaron al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Universidad de Georgia. Se utilizó una PCR para detectar ADN de ADV en saliva, orina y sangre en EDTA así como en los tejidos congelados de los hurones 6-10; la serología para ADV se realizó en sangre heparinizada y la hibridación *in situ* se llevó a cabo en secciones de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. Se utilizaron muestras de tejidos de un hurón que murió por AD como control positivo de la hibridación *in situ*.

7.2.5. Análisis estadístico

Se utilizó una prueba no paramétrica de correlación de Spearman entre el grado lesional (suma de los valores de todos los órganos) y la serología; entre el grado lesional y la PCR (orina + saliva) y entre la serología y la PCR (orina + saliva); se usó una $p \leq 0.05$ como nivel de significancia (Wessa, 2012).

7.3. Resultados

7.3.1. Patología

No se encontraron lesiones macroscópicas significativas durante la necropsia de los hurones. Los hallazgos histopatológicos fueron similares en todos los hurones. Los resultados se exponen en detalle en la Tabla 7.1 y en la Fig. 7.1. Las lesiones histológicas se detectaron principalmente en hígado, estómago e intestino delgado. En el hígado se observaron acúmulos de linfocitos pequeños con algunas células plasmáticas y algún neutrófilo aislado; estas infiltraciones linfoplasmocitarias enmascaraban las áreas portales y perivasculares en las zonas analizadas del hígado (Fig.7.1a-b). En el estómago, la lámina propia de la mucosa mostró abundantes linfocitos y algu-

nas células plasmáticas y, raramente, algún eosinófilo; también se observaron folículos linfoides dispersos que se extendían en profundidad hasta la muscular de la mucosa y zona superficial de la submucosa (Fig. 7.1c-d). En el intestino delgado, las vellosidades eran cortas y las criptas largas e hiperplásicas; la lámina propia adyacente mostró hiper celularidad con presencia de células plasmáticas, algunos eosinófilos y raramente algún linfocito. En algunas zonas, las células plasmáticas y los eosinófilos se localizaban desde la mucosa hasta la zona superficial de la submucosa (Fig. 7.1. e-f).

7.3.2. Serología, PCR e hibridación *in situ*

Los resultados de la serología y de la PCR de sangre, orina y saliva se muestran en la Tabla 7.2.

Los resultados de PCR e hibridación *in situ* en hígado e intestino delgado de los hurones 6-10 fueron todos negativos.

7.3.3. Estadística

La correlación entre el grado lesional y la serología fue de -0.564 ($p=0.089$); entre el grado lesional y la PCR fue de 0.205 ($p=0.569$); y entre la serología y la PCR fue de -0.646 ($p=0.043$).

Hurón	Hígado	Riñón	Estómago	Intestino delgado
1	2 M	0	0	0
2	2 M	0	2 M	3 D
3	1 M	0	0	0
4	2 M	0	1 M	2 D
5	1 M	0	2 M	0
6	2 M	0	1 F	0
7	2 M	0	0	1 D
8	1 M	1 M	0	1 D
9	2 M	0	0	0
10	1F	0	2 F	1 D

Tabla 7.1. Valoración del grado y distribución de la inflamación linfoplasmocitaria en 10 hurones clínicamente sanos.

Leyenda: Grado lesional: 0 = ausencia de alteraciones tisulares significativas; 1 = Lesiones mínimas; 2 = Lesiones leves; 3 = Lesiones moderadas; 4 = Lesiones graves. Grado de distribución: F = Focal; M = Multifocal; D = Difusa.

Hurón	PCR Sangre	PCR Orina	PCR Saliva	Serología
1	-	-	-	1:160
2	-	-	-	1:40
3	-	-	-	1:160
4	-	++	-	1:80
5	-	+	++	1:40
6	-	+	++	1:40
7	-	++	++	1:40
8	-	Sin muestra	-	1:80
9	-	-	+	1:80
10	-	-	+	1:80

Tabla 7.2. Serología y PCR para ADV de sangre, orina y saliva en 10 hurones clínicamente sanos.

Leyenda: - = negativo; + = ligeramente positivo; ++ = moderadamente positivo.

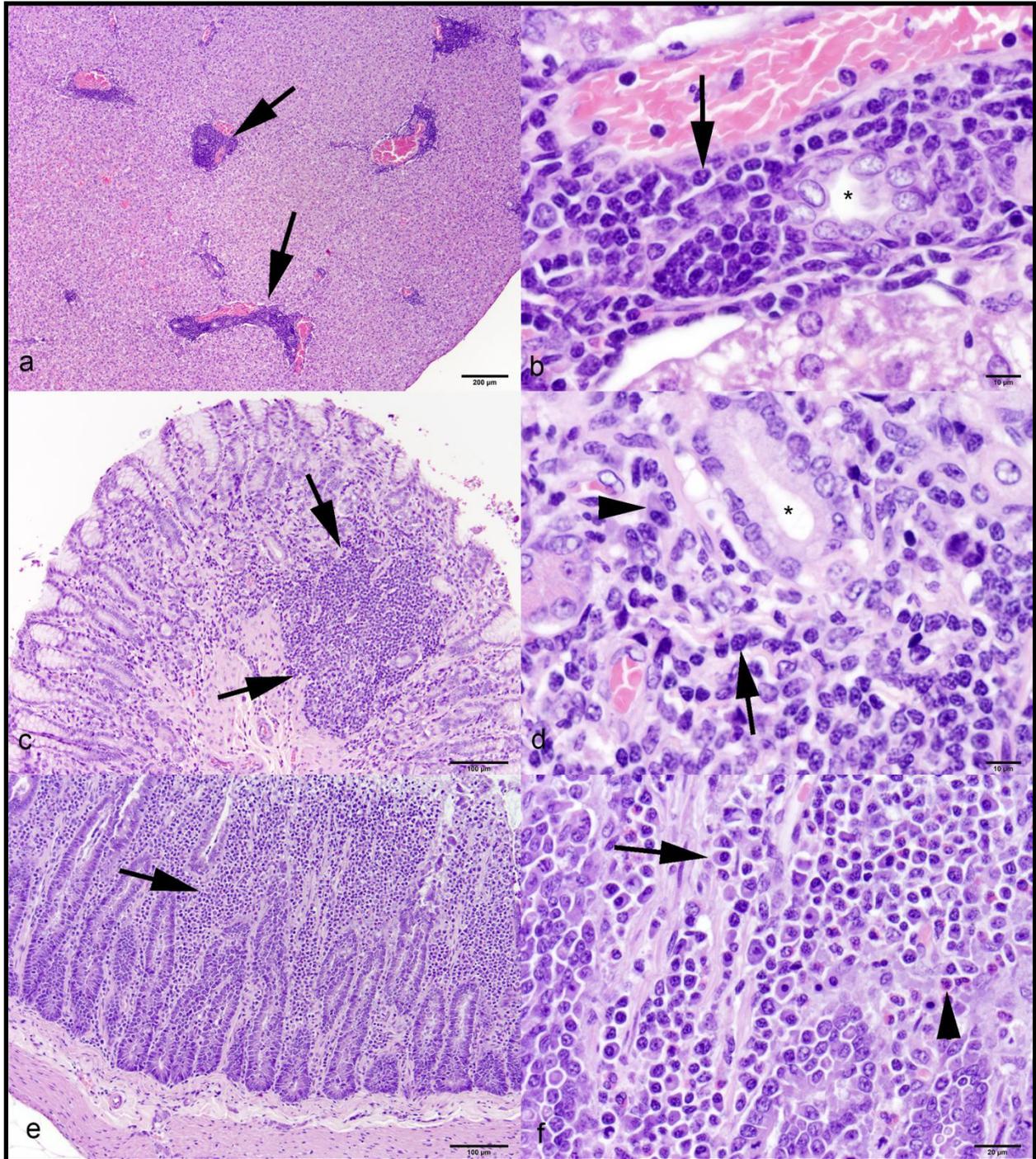


Figura 7.1. Alteraciones tisulares representativas observadas en hígado, estómago e intestino delgado en 10 hurones clínicamente sanos. (a) Hígado, hurón 4. Las áreas portales muestran hiper celularidad (flechas). HE. Barra = 200 μm . (b) Hígado, hurón 4. Mayor aumento de la Fig. 7.1.a. Las áreas portales muestran un número elevado de linfocitos (flecha). El asterisco representa la luz de un conducto biliar. HE. Barra = 10 μm . (c) Estómago, hurón 2. La mucosa gástrica presenta un ligera hiper celularidad y contiene un folículo linfoide (flecha). HE. Barra = 100 μm . (d) Estómago, hurón 2. Mayor aumento de la Fig. 7.1c. La lámina propia muestra un número aumentado de linfocitos (flecha) y células plasmáticas (punta de flecha). El asterisco indica la luz de una glándula gástrica. HE. Barra = 10 μm . (e) Intestino delgado, hurón 4. Hiper celularidad difusa de la mucosa de la lámina propia (flecha). HE. Barra = 100 μm . (f) Intestino delgado, hurón 4. Mayor aumento de la Fig. 7.1e. La lámina propia muestra un aumento de células plasmáticas (flecha) y eosinófilos (punta de flecha). HE. Barra = 20 μm .

7.4. Discusión

Los hurones del presente estudio provenían del ámbito de la investigación, no presentaron ningún problema de salud de acuerdo al examen clínico y todos eran seropositivos a ADV. En estudios previos con hurones se han citado seroprevalencias variables del 6 al 60% (Fox *et al.*, 1998; Oxenham, 1990; Porter *et al.*, 1982; Welchman *et al.*, 1993). Cuando se consideró la PCR para ADV, el 60% de los animales del presente estudio fueron positivos en orina y/o saliva. Se ha descrito con anterioridad la presencia de hurones clínicamente sanos con serología positiva e infección activa (con eliminación de virus por orina y heces) (Pennick *et al.*, 2005; Welchman *et al.*, 1993).

Todos los hurones del presente estudio mostraron infiltración tisular por linfocitos y/o células plasmáticas en al menos un órgano en cada animal analizado. La mayoría de estos infiltrados inflamatorios se observaron en el hígado y en el tracto gastrointestinal, y escasamente en el riñón, afectando sólo un 10% de los hurones. Este tipo de lesiones histopatológicas compatibles con AD en hurones no infectados por ADV o en hurones sin signos clínicos han sido referenciado por otros autores (Kenyon *et al.*, 1967; Porter *et al.*, 1982; Welchman *et al.*, 1993).

En el presente estudio no se detectó ADN de ADV en las muestras congeladas de hígado e intestino delgado de los hurones 6-10 utilizando PCR e hibridación *in situ*; la ausencia de ADN viral en las lesiones histopatológicas (independientemente de la serología positiva y la excreción de ADV) sugiere que esos hurones no padecían AD.

Los títulos serológicos no se correlacionaron bien con las lesiones tisulares; como ejemplo, los dos animales con los títulos de anticuerpos más altos (1:160, hurones 1 y 3) sólo mostraron infiltrados inflamatorios mínimos o moderados en hígado y carecían de infiltrados en riñón, estóma-

go e intestino delgado. El animal con el valor lesional de gravedad más alto (hurón 2) estaba entre los cuatro hurones con los títulos de anticuerpos más bajos (1:40).

Estadísticamente, la correlación entre la serología y el grado lesional no fue significativa, si bien los valores estadísticos deben analizarse con cautela debido al bajo tamaño muestral. La correlación entre la gravedad histológica y la PCR tampoco fue estadísticamente significativa, pero se observó una correlación negativa significativa entre la serología y la PCR; una vez más, debido al bajo tamaño muestral, los valores de estas correlaciones deben interpretarse con cautela.

La ausencia de una adecuada correlación entre las pruebas diagnósticas también se ha observado en otros estudios en los que se ha trabajado con AD. Porter *et al.* (1982) infectaron experimentalmente hurones con ADV y mostraron que sólo en algunos casos el nivel de anticuerpos estaba correlacionado de forma positiva con el nivel de hipergammaglobulinemia y con la gravedad de las lesiones histológicas.

En visones infectados con ADV, la correlación entre el ADN viral y las lesiones renales, así como la relación entre la serología (por contraelectroforesis) y las lesiones renales fueron bajas (Jackson *et al.*, 1996). Además, las lesiones hepáticas y renales no necesariamente se correlacionan entre sí (Jackson *et al.*, 1996). La correlación negativa observada en el presente estudio entre la serología y la PCR es más difícil de explicar: podría deberse al tamaño muestral, pero por otra parte, debería tenerse en cuenta el hecho de que el papel de los anticuerpos en el desarrollo de la enfermedad aún no está bien determinado.

En este sentido, la presencia de anticuerpos se ha relacionado directamente con el desarrollo de AD (Best y Bloom, 2005; Fox *et al.*, 1998), en cambio, en cachorros de visón se ha demostrado que los anticuerpos protegen de la enfermedad (Best y Bloom, 2005) y se ha observado que los

anticuerpos vacunales pueden colaborar en la prevención de la enfermedad (Aasted *et al.*, 1998; Castelruiz *et al.*, 2005). De ahí que se necesiten más estudios para comprender la relación entre anticuerpos e inducción/protección de AD.

Considerando que todos los animales del presente estudio se encontraban aparentemente sanos, no mostraron ningún síntoma clínico de enfermedad y eran positivos a PCR, serología e histología, la combinación de estos hallazgos no debe considerarse como una forma adecuada de diagnosticar AD. Sin embargo, se ha demostrado que las lesiones histopatológicas, los títulos serológicos y la hipergammaglobulinemia son más marcados en animales con AD que en animales libres de la enfermedad (Jackson *et al.*, 1996; Porter *et al.*, 1982).

En nuestra opinión, la detección de ADN viral en los órganos con lesiones compatibles de AD es la única forma eficaz de diagnosticar de forma precisa AD, si bien los signos clínicos, las lesiones histológicas, altos niveles de gammaglobulinas, anticuerpos y excreción de antígeno pueden también ayudar al diagnóstico. En nuestro trabajo no queda claro la utilidad de la PCR en sangre ya que esta prueba resultó negativa en todos los animales investigados, los cuales también fueron negativos a la enfermedad clínica.

7.5. Referencias bibliográficas

- Aasted B, Alexandersen S, Christensen J. 1998. Vaccination with Aleutian mink disease parvovirus (AMDV) capsid proteins enhances disease, while vaccination with the major non-structural AMDV protein causes partial protection from disease. *Vaccine*, 16: 1158-1165.
- Allender MC, Schumacher J, Thomas KV, McCain SL, Ramsay EC, James EW, Wise AG, Maes RK, Reel D. 2008. Infection with Aleutian disease virus-like virus in a captive striped skunk. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232: 742-746.
- Best SM, Bloom ME. 2005. Pathogenesis of Aleutian mink disease parvovirus and similarities to B19 infection. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 52: 331-334.
- Castelruiz Y, Blixenkron-Moller M, Aasted B. 2005. DNA vaccination with the Aleutian mink disease virus NS 1 gene confers partial protection against disease. *Vaccine*, 23: 1225-1231.
- Cheng F, Chen AY, Best SM, Bloom ME, Pintel D, Qiu JM. 2010. The capsid proteins of Aleutian Mink Disease Virus activate caspases and are specifically cleaved during infection. *Journal of Virology*, 84: 2687-2696.
- Fox JG, Pearson RC, Gorham JR. 1998. Viral diseases. *En* Fox JG (ed): *Biology and Diseases of the Ferret*. 2a ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, Estados Unidos: 355-374.

- Jackson MK, Ellis LC, Morrey JD, Li ZZ, Barnard DL. 1996. Progression of Aleutian disease in natural and experimentally induced infections of mink. *American Journal of Veterinary Research*, 57: 1753-1758.
- Kenyon AJ, Howard E, Buko L. 1967. Hypergammaglobulinemia in ferrets with lymphoproliferative lesions (Aleutian disease). *American Journal of Veterinary Research*, 28: 1167-1172.
- Oxenham M. 1990. Aleutian disease in the ferret. *Veterinary Record*, 126: 585-585.
- Pennick KE, Stevenson MAM, Latimer KS, Ritchie BW, Gregory CR. 2005. Persistent viral shedding during asymptomatic Aleutian mink disease parvoviral infection in a ferret. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17: 594-597.
- Porter HG, Porter DD, Larsen AE. 1982. Aleutian disease in ferrets. *Infection and Immunity*, 36: 379-386.
- Stevenson M, Gates L, Murray J, Bloom ME. 2001. Aleutian mink disease parvovirus: Implications for companion ferrets. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 23: 178-185.
- Une Y, Wakimoto Y, Nakano Y, Konishi M, Nomura Y. 2000. Spontaneous Aleutian disease in a ferret. *Journal of Veterinary Medical Science*, 62: 553-555.
- Welchman DD, Oxenham M, Done SH. 1993. Aleutian disease in domestic ferrets - diagnostic findings and survey results. *Veterinary Record*, 132: 479-484.

Wessa P. 2012. Spearman Rank Correlation (v1.0.1) in Free Statistics Software (v1.1.23-r7), Office for Research Development and Education, URL http://www.wessa.net/rwasp_spearman.wasp/

8. CONCLUSIONES FINALES

8.1. Conclusiones del capítulo 4 (Brote de moquillo canino en hurones domésticos)

- El moquillo canino en la población estudiada afectó a hurones jóvenes tras la pérdida de la inmunidad maternal.
- Los eventos estresantes, como el destete, el transporte, las cirugías rutinarias (esterilización) o los cambios de dieta pudieron facilitar la infección y el desarrollo de la enfermedad.
- Las características de la enfermedad espontánea (periodo de incubación, duración, gravedad, tropismo neurológico y mortalidad) variaron en comparación con las observadas en infecciones experimentales. Esto pudo estar asociado a la cepa del virus, la dosis infectiva, la vía de infección y la edad y el estado inmunitario del hurón.
- En este estudio se presentó el primer caso de cuerpos de inclusión compatible con la infección por herpesvirus en el pulmón de un hurón con moquillo.

8.2. Conclusiones del capítulo 5 (Descripción y características clínicas de la enfermedad por coronavirus sistémico en hurones)

- Se describieron por primera vez las características clínicas de la enfermedad por coronavirus sistémica en hurones. Esta enfermedad presentó características muy similares a la peritonitis infecciosa felina.
- La enfermedad afectó preferentemente a hurones jóvenes; los principales signos clínicos fueron la diarrea y la pérdida de condición corporal; y los principales hallazgos clínicos y laboratoriales

fueron la hipergammaglobulinemia policlonal y la presencia de masas abdominales a la palpación.

- La enfermedad fue mortal en todos los casos estudiados.
- Los gatos no parecieron tener ninguna implicación en esta enfermedad.

8.3. Conclusiones del capítulo 6 (Identificación de antígeno de coronavirus tipo 1 en las lesiones histológicas de la enfermedad sistémica por coronavirus en hurones)

- La enfermedad por coronavirus sistémico en hurones se caracterizó histológicamente por una reacción inflamatoria granulomatosa que afectó a múltiples órganos, de manera similar a lo que ocurre en la PIF en gatos.
- Los granulomas identificados se dividieron morfológicamente en 4 tipos: a) inflamación granulomatosa difusa en las superficies serosas; b) granulomas con áreas de necrosis; c) granulomas sin necrosis; y d) granulomas con neutrófilos (piogranulomas).
- La inmunohistoquímica demostró la presencia de antígeno de coronavirus tipo I en los macrófagos de las lesiones granulomatosas.

8.4. Conclusiones del capítulo 7 (Valoración de lesiones, anticuerpo y antígeno de enfermedad aleutiana en hurones clínicamente sanos)

- La prevalencia de anticuerpos contra el ADV fue muy alta en la población de hurones estudiada.

- No se encontró antígeno de ADV en las lesiones histológicas compatibles con AD, por lo que se concluyó que los infiltrados linfoplasmocitarios en esos animales no tienen por qué ser la consecuencia de una infección por ADV.

- Se describieron hurones sanos (sin AD) con lesiones histopatológicas compatibles con AD, PCR positiva para ADV y serología positiva frente a anticuerpos anti-ADV.

- No hubo una buena correlación entre los resultados de las diferentes pruebas diagnósticas (PCR, serología e histopatología).

- Se recomendó la detección de antígeno de ADV en tejidos con infiltrados linfoplasmacíticos como método de diagnóstico definitivo de AD.

FINAL CONCLUSIONS

Conclusions from chapter 4 (Outbreak of canine distemper in domestic ferrets)

- Canine distemper in the studied population affected young ferrets after the loss of maternal immunity.
- Stressful events, such as weaning, transportation, routine surgeries (spays and castrations) or diet changes could have facilitated infection and the development of clinical disease.
- The characteristics of spontaneous disease (incubation period, length of disease, severity, neurological tropism and mortality) differed significantly compared to observations in experimental infections. This could be related to the strain of virus, infective dose, infective route, and ferret's age and immune status.
- This study presented the first reported case of inclusion bodies compatible with herpesvirus infection in the lung of a ferret.

Conclusions from chapter 5 (Clinical aspects of Ferret Systemic Coronaviral Disease in domestic ferrets)

- The clinical characteristics of Ferret Systemic Coronaviral Disease are described for the first time. This disease has similar characteristics to Feline Infectious Peritonitis.
- The disease affected mainly young animals; most important clinical signs were diarrhea and loss of body condition; and the main clinical and laboratory findings were polyclonal hypergammaglobulinaemia and the presence of abdominal masses on palpation.

- The disease eventually caused the death of all the animals in the study.
- Cats did not seem to be implicated with the development of disease in ferrets.

Conclusions from chapter 6 (Identification of group I coronavirus antigen in multisystemic granulomatous lesions in domestic ferrets)

- Ferret Systemic Coronaviral Disease is characterised microscopically by a granulomatous inflammatory reaction affecting multiple organs, similar to the histological changes observed in cats with Feline Infectious Peritonitis.
- Granulomas were divided morphologically in 4 types: a) diffuse granulomatous inflammation in serosal surfaces; b) granulomas with areas of necrosis; c) granulomas without necrosis; and d) granulomas with neutrophils.
- Immunohistochemistry demonstrated the presence of antigen against type I coronavirus in the macrophages of the granulomatous lesions.

Conclusions from chapter 7 (Testing for Aleutian disease virus in clinically healthy domestic ferrets)

- Antibody prevalence against ADV was very high in the population studied.
- Antigen of ADV was not found in any of the histological lesions compatible with AD, and therefore it was concluded that lymphoplasmacytic infiltrates in these animals are not a necessary consequence of ADV infection.

- The study described healthy ferrets (without AD) with histological lesions compatible with AD, positive PCR for ADV and positive serology against ADV antibodies.
- There was a poor correlation among the results of the diagnostic tests performed (PCR, serology and histopathology).
- Detection of ADV antigen in tissues with lymphoplasmacytic infiltrates was recommended as a method to provide definitive diagnosis of AD.

9. AGRADECIMIENTOS

A Taiana Costa, por ayudarme y apoyarme en todo el proceso de escribir una tesis.

A Toño Fernández, por ayudarme a llevar todo este trabajo a buen puerto.

A las personas que participaron de forma activa en estos estudios, especialmente a Carlos López de la clínica veterinaria Maragall Exòtics, a Antonio Ramis y Jorge Martínez del Departamento de Sanidad y Anatomía Animales de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona, a Branson Ritchie, Chris Gregory y Paula Ciembor del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Georgia, y a Uriel Blas-Machado del Departamento de Patología Veterinaria de la Universidad de Georgia.

También a otras personas que fueron importantes a la hora de trabajar los casos o hacer algunas pruebas diagnósticas, como Ferran Bargalló, Esther Carpintero, Anna Tomás, Elizabeth Mackey y Manfred Reinacher.

A Veronica von Messling y Nico Schoemaker por su tiempo revisando el contenido científico de la tesis.

El estudio sobre enfermedad aleutiana se financió gracias a fondos de la *Pamela de Journo Endowment Fund*, Universidad de Georgia.

