

INFEZIONE ERPETICA DEL CANE E MORTALITÀ NEONATALE DEI CUCCIOLI: DESCRIZIONE DI UN FOCOLAIO

NICOLA DECARO¹, ANTONELLA TINELLI¹, MARCO CAMPOLO¹, GABRIELLA ELIA¹,
GIANLUCA VENTRIGLIA¹, VALENTINA TERIO¹, GIANCARLO BOZZO¹, FRANCO GUARDA²

¹Dipartimento di Sanità e Benessere Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria di Bari

²Dipartimento di Patologia Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino

Riassunto

Gli autori descrivono un episodio di infezione erpetica del cane in una cucciolata di razza Corso. Tutti i cuccioli (9) sono deceduti a seguito di una grave forma clinica sistemica, caratterizzata da manifestazioni respiratorie e dolorabilità addominale. L'esame autoptico ha evidenziato le lesioni tipiche dell'infezione da CaHV-1, confermata successivamente dagli esami istologici. Dal raschiato di mucosa nasale e dal rene di un cucciolo è stato isolato su cellule uno stipite herpesvirus (CaHV-1). La *polymerase chain reaction* (PCR) ha, invece, rilevato la presenza del genoma virale in tutti i campioni esaminati.

Summary

The authors describe an outbreak of canid herpesvirus 1 (CaHV-1) infection in a litter of nine Corso pups. All pups died after a systemic disease with respiratory symptoms and abdominal pain. The post-mortem findings were suggestive of a CaHV-1 infection, that was confirmed by histological examinations. A CaHV-1 strain was isolated from the nasal mucosa and from the kidney of a pup. Using the polymerase chain reaction (PCR), CaHV-1 was detected in all the samples examined.

INTRODUZIONE

Canid herpesvirus 1 (CaHV-1) appartiene alla famiglia *Herpesviridae*, sottofamiglia *Alphaherpesvirinae*, ed ha uno spettro d'ospite, *in vivo*, limitato ai canidi domestici e selvatici (Carmichael e Greene, 1990).

Numerosi studi sierologici hanno dimostrato che CaHV-1 è strettamente correlato, dal punto di vista antigenico, all'herpesvirus del gatto (FeHV-1) ed all'herpesvirus della foca (PhoHV-1) (Rota e Maes, 1990; Lincumpao et al., 1990; Lebach et al., 1994). In tempi più recenti, l'analisi filogenetica, effettuata confrontando i dati di sequenza del genoma virale, ha permesso di confermare la stretta affinità esistente tra CaHV-1, FeHV-1 e PhoHV-1 e di includere questi tre virus nel genere *Varicellovirus*, che comprende, tra gli altri, il virus del complesso varicella-zoster dell'uomo (HHV-3), gli herpesvirus equini tipo 1 (EHV-1) e tipo 4 (EHV-4), il virus della rinotracheite infettiva bovina (BoHV-1) ed il virus della

pseudorabbia (SuHV-1) (Limbach et al., 1994; Rémond et al., 1996; Tyack et al., 1997; Willoughby et al., 1997, 1999).

Il potere patogeno di CaHV-1 è correlato all'età dei soggetti colpiti. I cani adulti risultano recettivi all'infezione ma, generalmente, tendono a sviluppare una forma di malattia lieve o subclinica, con interessamento delle prime vie respiratorie o dell'apparato genitale (Hill e Maré, 1974; Kraft et al., 1986).

L'infezione del tratto genitale determina la comparsa di lesioni a carattere vescicolo-papuloso osservabili, nelle femmine, sulla mucosa vaginale e, nei maschi, alla base del pene e sulla piega prepuziale, con o senza presenza di scolo mucoso o muco-purulento. Tali lesioni sono responsabili della trasmissione dell'infezione per via venerea, tra gli adulti, e rappresentano la principale fonte di contagio per i cuccioli, i quali, alla nascita, vengono a contatto con le secrezioni vaginali altamente infettanti (Carmichael e Greene, 1990).

Nelle cagne l'infezione erpetica può inoltre causare turbe a carico della sfera riproduttiva, quali aborto, mummificazione fetale, parti prematuri e nascita di cuccioli disvitali (Anvik, 1991; Smith, 1997).

^{*}Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 7/2/2002 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 12/3/2002.

Nei cuccioli di età inferiore ad una settimana CaHV-1 può causare una grave malattia sistemica a carattere necrotizzante ed emorragico, con esito solitamente letale (Carmichael, 1970; Appel, 1987). I cuccioli possono infettarsi durante la vita fetale, per via transplacentare (Hashimoto et al., 1979, 1983), alla nascita, durante il passaggio nel canale del parto infetto (Hashimoto et al., 1982, 1983), oppure dopo la nascita, per contatto diretto con i secreti e gli escreti infetti di altri cuccioli (Carmichael et al., 1965a) o di soggetti adulti (Karpas et al., 1968).

I cuccioli infetti presentano ottundimento del sensorio e sono riluttanti ad assumere il latte; si lamentano insistentemente, a causa di una intensa dolorabilità addominale, facilmente evocabile mediante palpazione, ed emettono feci molli di colore giallo-verde. I soggetti, generalmente, non presentano ipertermia e muoiono, dopo 24-48 ore dalla comparsa dei primi segni clinici, evidenziando ipotermia, opistotono e convulsioni.

All'esame anatomico-patologico si possono riscontrare emorragie diffuse, versamenti siero-emorragici in cavità pleurica e peritoneale, degenerazione di vario grado dei parenchimi renale, epatico e polmonare, splenomegalia e linfadenopatia generalizzata (Carmichael e Greene, 1990).

Una caratteristica biologica degli herpesvirus è la capacità di determinare infezioni latenti, che possono riattivarsi in situazioni di deficit immunitario (Roizman et al., 1992). Nell'infezione erpetica del cane la riattivazione è stata ottenuta dopo la somministrazione di corticosteroidi ad animali con infezione naturale (Okuda et al., 1993). Nessuna informazione, tuttavia, è attualmente disponibile sull'evoluzione naturale della latenza e, in particolare, sui fattori che favoriscono la riattivazione in condizioni naturali.

L'infezione erpetica del cane possiede una vasta distribuzione su scala mondiale: focolai di infezione sono stati segnalati in USA (Carmichael et al., 1965b), Europa (Cornwell et al., 1966; Prydie et al., 1966; de Ratuld e Werner, 1968), Giappone (Motohashi e Tajima, 1966), Australia (Geldard et al., 1971) ed Africa (Bartsch et al., 1974).

Le indagini sierologiche, effettuate mediante test di sieroneutralizzazione (SN), hanno rilevato la presenza di anticorpi specifici per CaHV-1 nelle popolazioni canine in USA (Fulton et al., 1974), Svizzera (Engels et al., 1980), ed

Olanda (Osterhaus et al., 1977), con tassi di sieroprevalenza sempre contenuti e, comunque, non superiori al 12%. Valori non dissimili (11,4%) sono stati riportati in un'indagine sierologica effettuata in Puglia (Sagazio et al., 1998).

La messa a punto di un test immunoenzimatico (ELISA), più sensibile della SN, ha dimostrato che, in realtà, la sieroprevalenza per CaHV-1 è più elevata di quanto riportato nei precedenti studi, raggiungendo valori del 26,2% in Giappone (Takumi et al., 1990) e del 39,3% in Olanda (Rijsewijk et al., 1999).

Scopo della presente nota è quello di descrivere l'isolamento di CaHV-1 nel corso di un focolaio di infezione osservato in una cucciolata e caratterizzato da grave sintomatologia ed esito letale.

MATERIALI E METODI

1. Descrizione del caso clinico

Due cuccioli di razza Corso, appartenenti ad una cucciolata di 9 soggetti nati ad ottobre del 2001, all'età di 6 giorni, hanno iniziato a manifestare abbattimento, tosse, scolo nasale mucoso e rigonfiamento della regione addominale, accompagnato da intensa dolorabilità, con emissione di frequenti gemiti. I due cuccioli, nella stessa giornata, hanno smesso di poppare e dopo 2-3 giorni, rispettivamente, sono deceduti. Nell'arco di una settimana dalla comparsa dei segni clinici nei primi due soggetti, anche gli altri cuccioli hanno sviluppato una malattia grave, ad esito rapidamente letale.

Un solo cucciolo morto (257/01-T) è stato inviato al laboratorio per gli accertamenti.

All'esame anatomico-patologico è stato evidenziato un modesto versamento siero-emorragico in cavità pleurica ed addominale. I polmoni, fortemente congesti, presentavano ampie zone interessate da processi flogistici.

In cavità addominale, sono stati osservati degenerazione epatica, splenomegalia e notevole aumento di volume dello stomaco (Fig. 1). Nei reni, oltre alla degenerazione, sono stati evidenziati i tipici focolai necrotico-emorragici (Fig. 2).



FIGURA 1 - Splenomegalia e dilatazione gastrica.

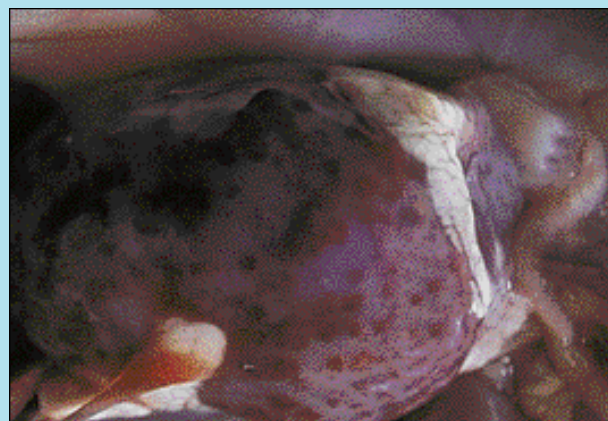


FIGURA 2 - Tipici focolai necrotico-emorragici sul parenchima renale.

2. Campioni

Gli esami virologici e istologici sono stati eseguiti su campioni di polmone, timo, cuore, fegato, reni, milza, linfonodi, cervello e mucosa nasale.

Contemporaneamente dalla madre sono stati prelevati un campione di sangue per gli esami sierologici e un tampone vaginale.

3. Isolamento virale

Per le prove di isolamento *in vitro*, sono state utilizzate cellule di adenocarcinoma mammario di cane in linea continua (A-72), sviluppate in terreno minimo essenziale di Dulbecco (D-MEM) con aggiunta del 10% di siero fetale bovino (SFB).

I campioni sono stati omogenati in D-MEM (10% p/v) e centrifugati a 4000 x g per 20 min a +4°C. Il surnatante di ciascun campione è stato quindi trattato con antibiotici (5000 UI/ml penicillina, 2500 µg/ml streptomina, 10 µg/ml anfotericina B) per 30 min a 37°C ed utilizzato per inoculare monostrati parzialmente confluenti di cellule A-72. Le cellule sono state quindi incubate a 35°C in atmosfera modificata al 5% di CO₂ e sottoposte ad osservazione quotidiana per rilevare l'eventuale comparsa di effetto citopatico (ecp).

In presenza di ecp, i monostrati infetti sono stati congelati e scongelati tre volte e, con i criolisi, sono state inoculate cellule A-72, sviluppate in piastre a 24 pozzetti con vetrino, utilizzando 6 pozzetti per campione.

A diversi intervalli di tempo, sulle cellule infette sono stati effettuati il test di immunofluorescenza indiretta (IFI), utilizzando un siero di cane positivo per CaHV-1, gentilmente fornito dal Dr. L.E. Carmichael (James Baker Institute for Animal Health, Cornell University, Ithaca, New York, USA), e la colorazione con ematossilina-eosina.

Dopo 6 giorni di incubazione, in assenza di ecp, le cellule sono state sottoposte a tre cicli di congelamento e scongelamento e sono stati effettuati ulteriori passaggi seriali.

4. PCR

Da ciascun campione in esame (25 mg) è stata effettuata l'estrazione del DNA virale con il kit *DNeasy Tissue kit* (Qiagen GmbH, Germania).

Per la PCR sono stati utilizzati i primers CHV1 e CHV2, in grado di amplificare un segmento del gene della timidina-chinasi di CaHV-1 dell'ampiezza di 493 bp (dal nucleotide 283 al 776), secondo quanto descritto da Schulze e Baumgärtner (1998).

Le sequenze dei primer utilizzati sono le seguenti:

- CHV1: 5'-TGC CGC TTT TAT ATA GAT G-3' *sense primer* (nucleotidi 283-301);
- CHV2: 5'-ACG AAC TTT TAC CAA CGC TT-3' *antisense primer* (nucleotidi 757-776).

La reazione di amplificazione è stata ottenuta in un volume di 100 µl costituiti da *PCR buffer* II 1 X, 1.5 mM di MgCl₂, 150 µM di dNTPs, 2.5 U di DNA polimerasi *Taq Gold* (Perkin-Elmer, Europe B.V., Monza) e 50 nM di cia-

scun primer, effettuando 35 cicli (denaturazione a 94°C per 1 min, *annealing* a 53°C per 1 min ed *extension* a 72°C per 1 min), seguiti da una fase finale di polimerizzazione a 72°C per 7 min.

Una aliquota di 8 µl dell'amplificato è stata quindi sottoposta a corsa elettroforetica in gel di agarosio 2% a 50 V per 120 min e visualizzata mediante colorazione con etidio bromuro.

5. Esami sierologici

La valutazione degli anticorpi verso CaHV-1 nel siero della madre è stata effettuata mediante test di sieroneutralizzazione (SN) e di immunofluorescenza indiretta (IFI). Per il test SN, diluizioni a raddoppio del siero in D-MEM, partendo dalla diluizione 1:2 e fino alla diluizione 1:256, sono state messe a contatto con 100 dosi infettanti tessuto colture (TCID) di uno stipite CaHV-1 fornito dal Dr. L.E. Carmichael.

Dopo incubazione per un'ora a temperatura ambiente ad ogni miscela siero-virus sono state aggiunte 20.000 cellule A-72. Le piastre sono state poste ad incubare in termostato a CO₂, a temperatura di 35°C, e la lettura è stata effettuata dopo 5 giorni.

Il test IFI è stato effettuato su cellule A-72 sviluppate su vetrini ed infettate con lo stesso stipite CaHV-1. Dopo 48 h di incubazione, le cellule sono state fissate con acetone freddo ed utilizzate per il test impiegando diluizioni a raddoppio del siero della madre e di un siero di controllo negativo. Dopo 30 min di incubazione a 37°C e 3 lavaggi in PBS, su ciascun vetrino è stato aggiunto un siero di coniglio anti-IgG di cane marcato con fluoresceina (Sigma-Aldrich Chemie, Germania). Dopo ulteriore contatto a 37°C per 30 min, i vetrini sono stati lavati in PBS ed osservati al microscopio a fluorescenza.

6. Analisi con enzimi di restrizione

L'estrazione del DNA del virus isolato è stata effettuata utilizzando le metodiche descritte in precedenza (Buonavoglia et al., 1996).

Otto µg del DNA diluiti in 50 µl di miscela di reazione (0,01 M Tris-acetato, pH 7.5, 0,01 M magnesio acetato, 0,05 M potassio acetato) sono stati digeriti con gli enzimi *XbaI* [T CTAGA], *BamHI* [G GATCC] e *PstI* [CTGCA G] (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Dopo incubazione a 37°C per 2.5 h ed inattivazione in ghiaccio, i digeriti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di agarosio 0,8% a 30 V *overnight* ed i pattern di migrazione sono stati visualizzati al transilluminatore UV previa colorazione con etidio bromuro.

È stato contemporaneamente esaminato lo stipite CaHV-1 di riferimento fornito dal Dr. L.E. Carmichael.

7. Esami istologici

I campioni d'organo sono stati fissati in formalina tamponata al 10% ed inclusi in paraffina. Le sezioni istologiche ottenute sono state colorate con ematossilina-eosina.

RISULTATI

Le cellule inoculate con il raschiato di mucosa nasale e con l'omogenato di rene hanno evidenziato, già al 1° passaggio ed in terza giornata, un ecp caratterizzato dalla comparsa di focolai di cellule arrotondate, con tendenza alla formazione di sincizi e successiva lisi del monostrato (Fig. 3). Tale ecp, tipico dell'infezione da herpesvirus, inizialmente di modesta entità, è diventato più evidente nei successivi passaggi.

Nei monostrati cellulari colorati con ematossilina-eosina sono stati evidenziati corpi inclusi intranucleari (Fig. 4), mentre nel test IFI le cellule hanno mostrato una marcata fluorescenza intranucleare (Fig. 5).

Nei monostrati di cellule inoculate con gli altri campioni non è stato osservato ecp.

La PCR ha fornito esito positivo per CaHV-1 su tutti i campioni prelevati al cucciolo ed è risultata negativa sul tampone vaginale prelevato alla madre. L'amplificato PCR, secondo quanto atteso, è risultato pari a 493 bp (Fig. 6).

Il siero della madre è risultato negativo per anticorpi nel test SN, mentre nel test IFI ha evidenziato un titolo anticorpale pari a 1:160. Il siero di controllo è risultato costantemente negativo.

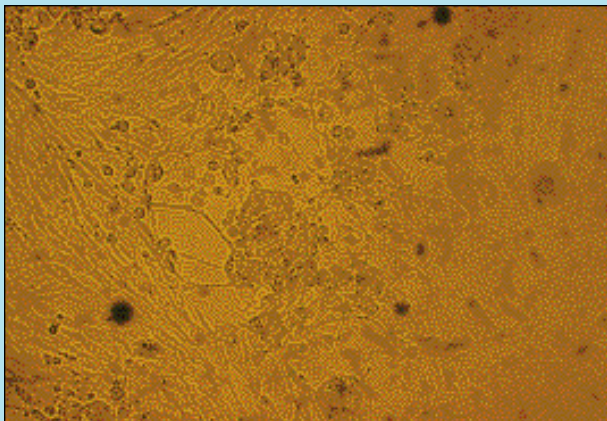


FIGURA 3 - Cellule A-72 infette: effetto citopatico.

Lo stipite herpesvirus isolato, dopo digestione con endonucleasi, ha evidenziato pattern di migrazione simili allo stipite CaHV-1 di riferimento (Fig. 7).

All'esame istologico il timo ha evidenziato grave edema interstiziale associato ad atrofia della midollare (Fig. 8). Nel rene sono state osservate necrosi coagulativa e dissoluzione totale dell'epitelio tubulare (Fig. 9); nei glomeruli sono stati evidenziati congestione dei capillari, vacuolizzazione, ispessimento della membrana basale e ialinosi (Fig. 10). A carico dell'encefalo è stata osservata leptomeningite non purulenta (Fig. 11), mentre nella milza era evidente una parziale deplezione linfoide di cellule di origine mesenchimale.

DISCUSSIONE

L'infezione erpetica del cane, anche se segnalata raramente, rappresenta una importante patologia infettiva in grado di causare danni a carico della sfera riproduttiva negli adulti e mortalità nei cuccioli di 7-10 giorni di età. Tali quadri morbosi possono assumere un particolare significato negli ambienti ad elevata densità, quali gli allevamenti, i canili e le pensioni per cani, dove la stretta coabitazione tra gli animali e le frequenti condizioni di stress possono

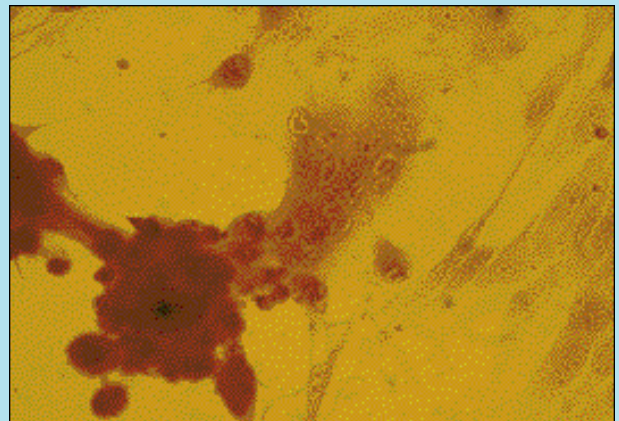


FIGURA 4 - Cellule A-72 infette: corpi inclusi intranucleari. Colorazione ematossilina-eosina.

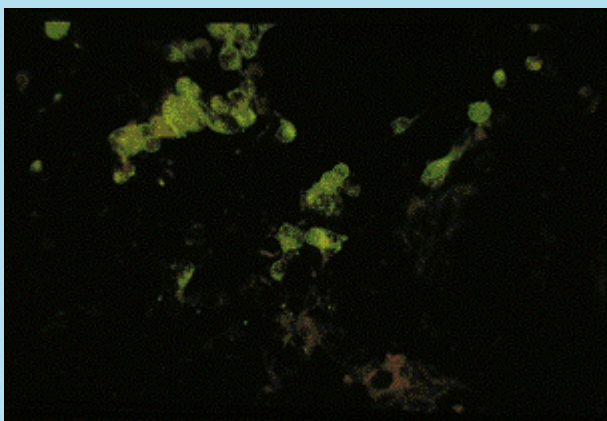


FIGURA 5 - Cellule A-72 infette: immunofluorescenza.

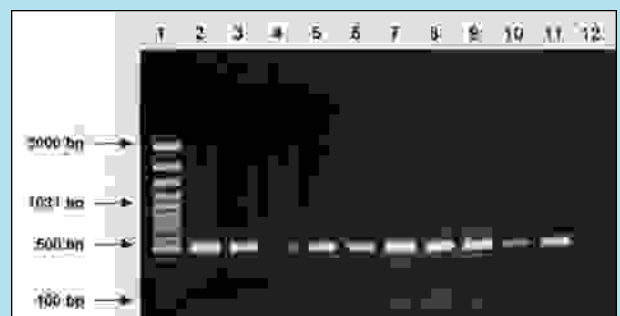


FIGURA 6 - PCR per CaHV-1 (amplificato di 493 bp). Linea 1: marker Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas GmbH, Germania). Linea 2: CaHV-1 stipite Carmichael. Linee 3-11: campioni del cucciolo 257/01-T (vedi testo). Linea 12: controllo negativo.

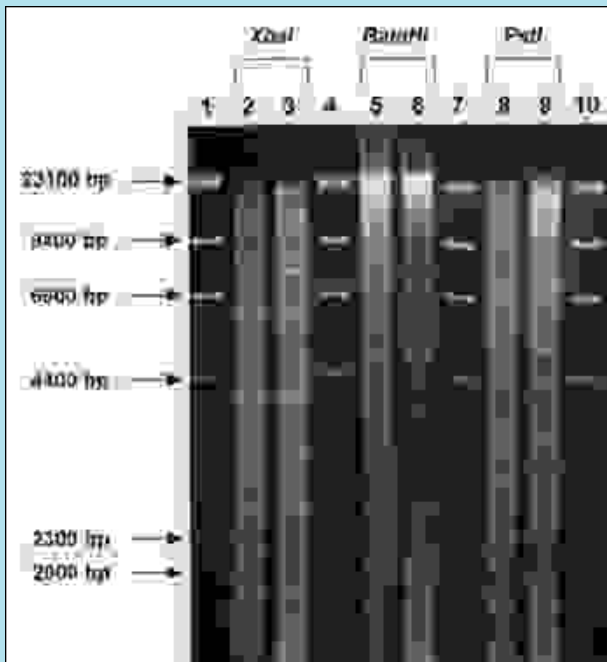


FIGURA 7 - Patterns di migrazione degli stipiti CaHV-1 digeriti con XbaI (linee 2, 3), BamHI (linee 5, 6) e PstI (linee 8, 9). Linee 2, 5, 8: CaHV-1 stipite Carmichael. Linee 3, 6, 9: CaHV-1 stipite isolato. Linee 1, 4, 7, 10: marker DNA di fago lambda digerito con HindIII (MBI Fermentas GmbH, Germania).

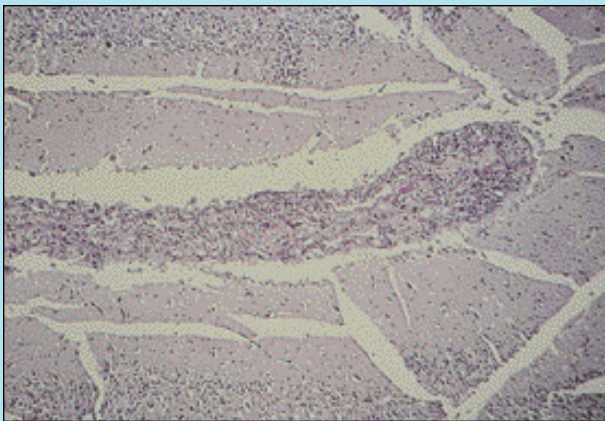


FIGURA 8 - Encefalo: leptomeningite non purulenta.

favorire la diffusione dell'infezione e la comparsa di forme clinicamente manifeste della malattia.

La diagnosi di laboratorio di infezione da CaHV-1 presenta tuttavia, notevoli difficoltà.

La sieroneutralizzazione (SN) utilizzata per la ricerca degli anticorpi, ha evidenziato una scarsa sensibilità (Takumi et al., 1990). Anche l'ELISA, pur essendo dotata di maggiore sensibilità, non è in grado di rilevare il 100% delle infezioni pregresse, in quanto gli anticorpi per CaHV-1 persistono generalmente per circa 60 giorni (Evermann, 1989).

Inoltre, nel siero di animali con infezione in atto gli anticorpi risultano svelabili non prima di 2-3 settimane dall'inizio dell'infezione (Takumi et al., 1990).

Il siero della cagna esaminato nella presente indagine è risultato privo di anticorpi neutralizzanti per CaHV-1,

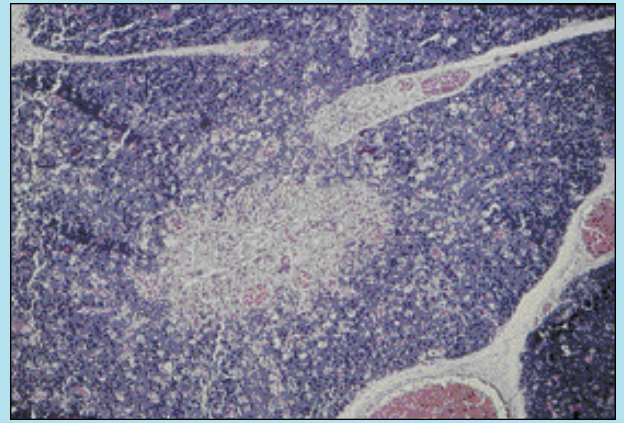


FIGURA 9 - Timo: atrofia della midollare.

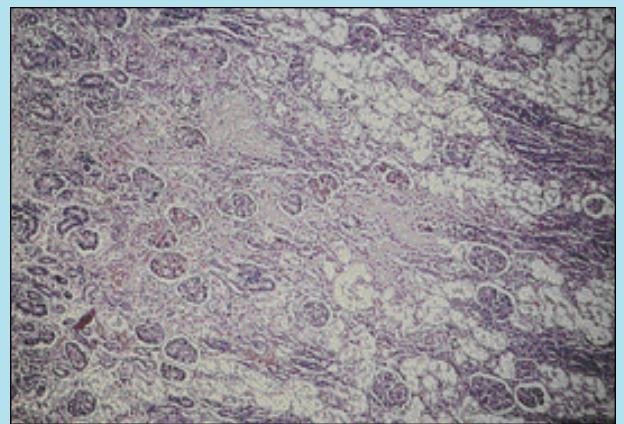


FIGURA 10 - Rene: necrosi coagulativa e dissoluzione epiteliale dei tubuli.

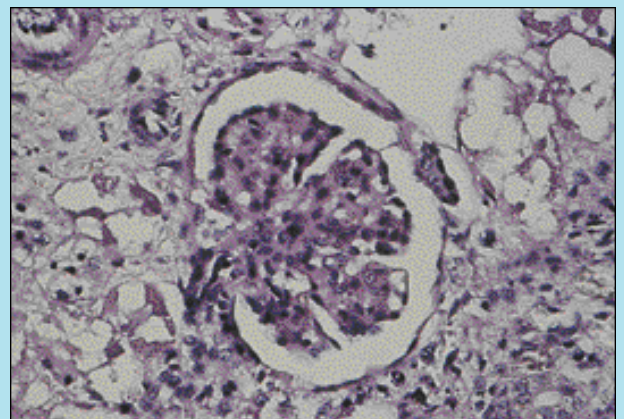


FIGURA 11 - Rene: particolare di un glomerulo sofferente in preda a conglutinazione dei capillari, vacuolizzazione, ispessimento della membrana basale e iniziale ialinosi.

mentre ha evidenziato un titolo anticorpale pari a 1:160 nel test IFI.

Il sospetto clinico di infezione da CaHV-1 deve essere quindi necessariamente confermato dalla diagnosi virologica.

L'isolamento del virus, a partire da tamponi nasali e campioni d'organo rappresenta la tecnica diagnostica utilizzata di routine, ma, con una certa frequenza, non è in

grado di evidenziare la presenza di CaHV-1 nei tessuti infetti, perché il virus è presente a basso titolo infettante nei tessuti e nei secreti degli animali infetti e, soprattutto, perché il virus si adatta con difficoltà alla coltivazione *in vitro*.

Al contrario, le tecniche di biologia molecolare, quali l'ibridazione *in situ* (ISH) e la PCR, sono caratterizzate da elevata sensibilità e specificità, essendo in grado di rilevare la presenza anche di piccole quantità di acido nucleico (Schulze e Baumgärtner, 1998). Queste tecniche, in particolare la PCR, rappresentano le metodiche di elezione per la diagnosi di infezione erpetica del cane.

Nel nostro studio il virus è stato isolato solo dai campioni di mucosa nasale e rene, che rappresentano i distretti target nei quali CaHV-1 è maggiormente presente.

Mediante la PCR, invece, è stato possibile rilevare la presenza del genoma virale in tutti i campioni esaminati.

Il ruolo patogeno significativo di CaHV-1 per i cani adulti e, soprattutto, per i cuccioli richiede l'adozione di idonee misure di profilassi in grado di controllare la diffusione dell'infezione. In quest'ottica, assume notevole importanza l'impiego di test diagnostici sensibili e rapidi come la PCR.

Parole chiave

Cucciolo, herpesvirus, isolamento virale, PCR.

Key words

Pup, herpesvirus, virus isolation, PCR.

Bibliografia

- Carmichael LE, Greene CE: Canine herpesvirus infection. In: Infectious Diseases of the Dog and Cat. Ed. by CE Greene. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1990, pp 252-258.
- Rota PA, Maes RK: Homology between feline herpesvirus-1 and canine herpesvirus. Arch. Virol. 115: 139-145, 1990.
- Licumpao JA, Horimoto T, Xuam X, et al: Immunological relationship between feline herpesvirus type 1 (FHV1) and canine herpesvirus as revealed by polyvalent and monoclonal antibodies. Arch. Virol. 111: 165-176, 1990.
- Lebich M, Harder TC, Frey H-R, et al: Comparative immunological characterisation of type-specific and conserved B-cell epitopes of feline and canine herpesviruses. Arch. Virol. 136: 335-347, 1994.
- Limbach KJ, Limbach MP, Comte D, et al: Nucleotide sequence of the genes encoding the canine herpesvirus gB, gC and gD homologues. J. Gen. Virol. 75: 2029-2039, 1994.
- Rémond M, Sheldrick P, Lebreton F, et al: Gene organisation in the UL region and inverted repeats of the canine herpesvirus genome. J. Gen. Virol. 77: 37-48, 1996.
- Tyack SG, Studdert MJ, Johnson MA: Nucleotide sequence of canine herpesvirus homologues of herpes simplex virus type 1 US2, US3, glycoproteins I and E, US8.5 and US9 genes. DNA Seq. 7: 365-368, 1997.
- Willoughby K, Bennett M, Williams RA, et al: Sequences of the ribonucleotide reductase-encoding genes of feline herpesvirus 1 and molecular phylogenetic analysis. Virus Genes 15: 203-218, 1997.
- Willoughby K, Bennett M, McCracken CM, et al: Molecular phylogenetic analysis of feline herpesvirus 1. Vet. Microbiol. 69: 93-97, 1999.
- Hill H, Maré CJ: Genital disease in dogs caused by canine herpesvirus. Am. J. Vet. Res. 35: 669-672, 1974.
- Kraft S, Evermann JF, McKeirnan AJ, et al: The role of neonatal canine herpesvirus infection in mixed infections in older dogs. Compend. Continuing Edu. Practising Veterinarian 8: 688-694, 1986.
- Anvik JO: Clinical considerations of canine herpesvirus infection. Vet. Med. 86: 394-403, 1991.
- Smith KC: Herpesviral abortion in domestic animals. Vet. J. 153: 253-268, 1997.
- Carmichael LE: Herpesvirus canis: aspects of pathogenesis and response. J. Am. Vet. Med. Assoc. 156: 1714-1721, 1970.
- Appel MJ: Canine herpesvirus. In: Virus Infections of Vertebrates. Ed. by MC Horzinek, series ed., Vol. I. Virus Infections of Carnivores. Ed by MJ Appel, Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Science Publishers, 1987, pp 5-15.
- Hashimoto A, Hirai K, Okada K, et al: Pathology of the placenta and newborn pups with suspected intrauterine infection of canine herpesvirus. Am. J. Vet. Res. 30: 1236-1240, 1979.
- Hashimoto A, Hirai K, Suzuki Y, et al: Experimental transplacental transmission of canine herpesvirus in pregnant bitches during the second trimester of gestation. Am. J. Vet. Res. 44: 610-614, 1983.
- Hashimoto A, Hirai K, Yamaguchi T, et al: Experimental transplacental infection of pregnant dogs with canine herpesvirus. Am. J. Vet. Res. 43: 844-850, 1982.
- Carmichael LE, Squire RA, Krook L: Clinical and pathologic features of a fatal viral disease of newborn pups. Am. J. Vet. Res. 26: 803-814, 1965a.
- Karpas A, King NW, Garcia FG, et al: Canine tracheobronchitis: isolation and characterization of the agent with experimental reproduction of the disease. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127: 45-52, 1968.
- Roizman B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, et al: The family Herpesviridae: an update. Arch. Virol. 123: 425-443, 1992.
- Okuda Y, Ishida K, Hashimoto A, et al: Virus reactivation in bitches with a medical history of herpesvirus infection. Am. J. Vet. Res. 54: 551-554, 1993.
- Carmichael LE, Strandberg JD, Barnes FD, et al: Identification of a cytopathogenic agent infectious for puppies as a canine herpesvirus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 12: 644-650, 1965b.
- Cornwell HJC, Wright NG, Campbell RSF, et al: Neonatal disease in the dog associated with a herpes-like virus. Vet. Rec. 79: 661-662, 1966.
- Prydie J, Harrison MJ, Graham J: Isolation of a canine herpesvirus. Vet. Rec. 79: 660-661, 1966.
- de Ratuld Y, Werner GH: Le virus herpétique canin. Ann. Inst. Pasteur 112: 802-807, 1968.
- Motohashi T, Tajima M: Isolation of a herpes virus from a diseased adult dog in Japan. Jpn. J. Vet. Sci. 28: 307-314, 1966.
- Geldard H, Geering WA, Bagust TJ: Isolation of a herpesvirus from neonatal dogs in Australia. Aust. Vet. J. 47: 286, 1971.
- Bartsch RC, Husbschle OJB, Els HJ: Canine herpesvirus infection: literature review and case report. J. S. Afr. Vet. Med. Ass. 45: 81-85, 1974.
- Fulton RW, Ott RL, Duenwald JC, et al: Serum antibodies against canine respiratory viruses: prevalence among dogs of eastern Washington. Am. J. Vet. Res. 35: 853-855, 1974.
- Engels M, Mayr-Biback B, Ruckstuhl B, et al: Die Seroepizootologie der caninen Herpesvirusinfektion in der Schweiz und präliminäre Versuche mit einer Vakzine. Zbl. Vet. Med. B 27: 257-267, 1980.
- Osterhaus A, Berghuis-de Vries J, Steur K: Antiviral antibodies in dogs in The Netherlands. Zbl. Vet. Med. B 24: 123-133, 1977.
- Sagazio P, Cirone F, Pratelli A, et al: Infezione da herpesvirus del cane. Diffusione sierologica in Puglia. O. D. V. 5: 63-67, 1998.
- Takumi A, Kusanagi K, Tuchiya K, et al: Serodiagnosis of canine herpesvirus infection - Development of an enzyme linked immunosorbent assay and its comparison with two improved methods of serum neutralization test. Jpn. J. Vet. Sci. 52: 241-250, 1990.
- Rijsewijk FAM, Luiten EJ, Daus FJ, et al: Prevalence of antibodies against canine herpesvirus 1 in dogs in The Netherlands. Vet. Microbiol. 65: 1-7, 1999.
- Schulze C, Baumgärtner W: Nested polymerase chain reaction and *in situ* hybridization for diagnosis of canine herpesvirus infection in puppies. Vet. Pathol. 35: 209-217, 1998.
- Buonavoglia C, Tempesta M, Cavalli A, et al: Reactivation of caprine herpesvirus 1 in latently infected goats. Comp. Immun. Microbiol. Inf. Dis. 19: 275-281, 1996.
- Evermann JF: Diagnosis of canine herpetic infections. In: Current Veterinary Therapy. Ed. by RW Kirk and JD Bonagura, Philadelphia, PA, W.B. Saunders, 1989, pp 1313-1316.