



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia

**“EVALUACIÓN POR INMUNOHISTOQUÍMICA DE *CORONAVIRUS* Y
ROTAVIRUS EN TEJIDOS DE PEQUEÑOS RUMIANTES”**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia

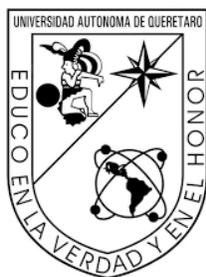
Presenta:

Maximiliano Ruiz Olvera

Dirigido por:

Dra. Irma Eugenia Candanosa Aranda

Santiago de Querétaro, Querétaro. 2021



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

EVALUACIÓN POR INMUNOHISTOQUÍMICA DE
CORONAVIRUS Y ROTAVIRUS EN TEJIDOS DE PEQUEÑOS
RUMIANTES

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Presenta:

Maximiliano Ruiz Olvera

Dirigido por:

Codirectora: Irma Eugenia Candanosa Aranda

Alejandro Enríquez Vázquez

Presidente

Firma

Irma Eugenia Candanosa Aranda

Secretario

Firma

Alfredo Pérez Guiot

Vocal

Firma

Xochitl Zambrano Estrada

Vocal

Firma

Paola Jazmín Aranda Vargas

Vocal

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Febrero 2021
México

RESUMEN

El síndrome diarreico neonatal en cabritos y corderos es una de las enfermedades más comunes que causan alta morbilidad y mortalidad. Aún no se describe la presencia de *Rotavirus* y *Coronavirus* en pequeños rumiantes en México. Por la técnica de inmunohistoquímica se observó la presencia de *Coronavirus* y *Rotavirus* en secciones de intestinos de corderos y cabritos con diarrea y enteritis remitidos a USEDICO de la FMVZ-UNAM en un periodo de 10 años, en total fueron remitidos 402 animales. La inmunopositividad más alta a *Rotavirus* se reportó en cabritos con diarrea y enteritis con un 18%, los corderos con diarrea y enteritis presentaron la inmunopositividad más alta a *Coronavirus* en un 19.6%. Tanto en cabritos como en corderos se observó una combinación de *Rotavirus* y *Coronavirus* (6.6%, 11.4% respectivamente). Además, en cabritos la combinación con otros enteropatógenos fue más representativa entre *Rotavirus* y bacterias (3.8%). En corderos las combinaciones representativas fueron entre *Rotavirus* y coccidias, *Rotavirus* y bacterias; ambas con un 4.9%. El síndrome diarreico neonatal en pequeños rumiantes del altiplano mexicano entre 0-120 días de edad puede estar asociado con agentes virales, a pesar de que se identificó coinfección con otros enteropatógenos.

Palabras clave: Enteritis, *Coronavirus*, *Rotavirus*, inmunohistoquímica, corderos, cabritos.

SUMMARY

Neonatal diarrheal syndrome in kids and lambs is one of the most common diseases that causes high morbidity and mortality. The presence of *Rotavirus* and *Coronavirus* in small ruminants in Mexico has not yet been described. Using the immunohistochemical technique, the presence of *Coronavirus* and *Rotavirus* was observed in sections of intestines of lambs and kids with diarrhea and enteritis referred to USEDICO of the FMVZ-UNAM in a 10-year period, a total of 402 animals were referred. The highest immunopositivity to *Rotavirus* was reported in kids with diarrhea and enteritis with 18%, lambs with diarrhea and enteritis presented the highest immunopositivity to *Coronavirus* in 19.6%. In both kids and lambs a combination of *Rotavirus* and *Coronavirus* was observed (6.6%, 11.4% respectively). In addition, in kids the combination with other enteropathogens was more representative between *Rotavirus* and bacteria (3.8%). In lambs the representative combinations were between *Rotavirus* and coccidia, *Rotavirus* and bacteria; both with 4.9%. Neonatal diarrheal syndrome in small ruminants from the Mexican highlands between 0-120 days of age may be associated with viral agents, despite the fact that co-infection with other enteropathogens has been identified.

Key words: Viral enteritis, lambs, kids, *Coronavirus*, *Rotavirus*, immunohistochemistry.

DEDICATORIAS

A aquellos que me inspiran, y que son los pilares de mi vida enseñándome a ser humano y profesional
A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la UNAM que a través del financiamiento PAPIME PE215418 fue posible el financiamiento del trabajo, así también al CEIEPAA; especialmente al Dr. Héctor Basurto Camberos; director técnico del centro de la FMVZ-UNAM, por su disposición y atención a permitirme realizar mi estancia para realizar el presente trabajo. Además, agradezco a la USEDICO, especialmente a la Dra. Carolina Segundo Zaragoza, coordinadora de la unidad, por permitirme llevar a cabo el procedimiento en mencionada unidad.

Agradezco al Departamento de Patología, especialmente a la Dra. Mireya Juárez Ramírez, coordinadora del laboratorio de inmunohistoquímica; por la oportunidad de llevar a cabo parte del procedimiento técnico así también al señor Miguel por el apoyo en el proceso.

Con una particular mención y mucho cariño agradezco a mi tutora la Dra. Irma Eugenia Candanosa Aranda, por su incondicional apoyo, enseñanza, atención, confianza; que, por su ética, y humanidad, me inspira para ser algún día un patólogo y una mejor persona con mis semejantes y guardar respeto a los animales. Así también a mi tutor y amigo MMVZ Alfredo Pérez Guiot, por su apoyo, confianza, amistad y sobre todo por estar allí atento a la enseñanza. Además, al Dr. Alejandro Enríquez, por su enseñanza y amistad, a la Dra. Xóchitl Zambrano y la MSPAS Paola Aranda, por su atención y apoyo en mi proceso de revisión y titulación.

Por supuesto agradezco al personal de la USEDICO; que más que personal, amigos, Rocío Valdez; por tu amistad sincera, enseñanzas profesionalmente y en el ámbito de la vida, Eloy, Irma, Noemi, Daniel y Manuel, porque en cualquier momento estuvieron atentos para lo que necesité ¡Gracias!, así también a mis compañeros de estancia: Laura González por su cálida amistad, sinceridad y enseñanza, a mi querido amigo Jorge González , por todo su apoyo, su amistad, y sobre todo, porque siempre estabas y has estado allí cuando te necesite.

A todos mis compañeros de estancia de las diferentes áreas, que me dejaron sus enseñanzas y goce de una buena amistad y amor de parte de todos; Ivo, Moisés, Eli, Miroslava, Sara, Gilberto, Brenda, Olga, Iván, por supuesto a ti Karen Zaragoza que siempre estuviste allí para mí.

Si me he olvidado de alguien, sepa que falta en esta lista, pero no en mi corazón

INDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	1
DEDICATORIAS	2
AGRADECIMIENTOS	3
ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	6
Coronavirus	6
<i>Patogenia</i>	7
<i>Lesiones macroscópicas y microscópicas</i>	10
Rotavirus	11
<i>Patogenia</i>	12
<i>Lesiones macroscópicas y microscópicas</i>	16
<i>Antecedentes</i>	17
Infecciones mixtas	18
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS PARTICULARES	19
MATERIAL Y MÉTODOS	19
Declaración de ética	19
Estudio retrospectivo	19
Gradificación de lesiones microscópicas	20
Método de inmunohistoquímica	21

<i>Estandarización de la prueba de inmunohistoquímica para Rotavirus por la técnica de estreptoavidina peroxidasa.....</i>	21
<i>Estandarización de la prueba de inmunohistoquímica para Coronavirus, por la técnica de peroxidasa por micropolímeros</i>	22
Determinación porcentual de inmunopositividad	24
Correlación de Pearson entre edad de los animales y gravedad de lesiones microscópicas	24
RESULTADOS.....	25
<i>Estudio retrospectivo</i>	25
<i>Lesiones macroscópicas</i>	26
<i>Evaluación de lesiones histológicas.....</i>	27
<i>Cabritos</i>	28
<i>Corderos.....</i>	28
<i>Inmunohistoquímica.....</i>	29
<i>Coronavirus.....</i>	29
<i>Rotavirus.....</i>	32
<i>Correlacion de P de Pearson entre la edad y la gravedad de las lesiones .</i>	34
<i>Frecuencia de infecciones mixtas en casos de diarrea.....</i>	35
<i>Otros hallazgos.....</i>	37
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	42
REFERENCIAS.....	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Estudios que identificaron <i>Coronavirus</i> en borregos y cabras por diferentes técnicas diagnósticas.....	10
Cuadro 2. Estudios donde identificaron <i>Rotavirus</i> en borregos y cabras por diferentes técnicas diagnósticas.....	17
Cuadro 3. Definición de las categorías de la gravedad de lesiones microscópicas.	20
Cuadro 4. Casos remitidos a la USEDICO por presentar SDN	25
Cuadro 5. Hallazgos y lesiones macroscópicas en tracto gastrointestinal encontradas en casos de cabritos y corderos remitidos por SDN.....	26
Cuadro 6. Gradificación de lesiones intestinales en corderos y cabritos inmunopositivos a <i>Coronavirus</i> y <i>Rotavirus</i> . USEDICO. FMVZ-UNAM. 2009-2019.	29
Cuadro 7. Inmunopositividad a <i>Coronavirus</i> en corderos y cabritos que cursaron con SDN, remitidos a la USEDICO. FMVZ-UNAM. 2009-2019.....	31
Cuadro 8. Inmunopositividad a <i>Rotavirus</i> en corderos y cabritos que cursaron con SDN, remitidos a la USEDICO. FMVZ-UNAM. 2009-2019.....	34
Cuadro 9. Correlación de lesiones intestinales inmunopositivos a <i>Coronavirus</i> y <i>Rotavirus</i> con la edad (0 a 120 días) en cabritos. USEDICO. FMVZ-UNAM. 2009-2019.	34
Cuadro 10. Correlación de lesiones intestinales inmunopositivos a <i>Coronavirus</i> y <i>Rotavirus</i> con la edad (0 a 120 días) en corderos. USEDICO. FMVZ-UNAM. 2009-2019.	35
Cuadro 11. Infecciones mixtas en cabritos inmunopositivos a <i>Coronavirus</i> y <i>Rotavirus</i>	36
Cuadro 12. Casos de cabritos y corderos inmunopositivos a <i>Coronavirus</i> y <i>Rotavirus</i> con cuadros neumónicos.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fisiopatología de <i>Coronavirus</i>	9
Figura 2. Fisiopatología de <i>Rotavirus</i>	15
Figura 3. Lesiones y hallazgos macroscópicos	27
Figura 4. Lesiones microscópicas en intestinos H&E	27, 28
Figura 5. Inmunopositividad a <i>Coronavirus</i>	30
Figura 6. Frecuencia de inmunopositividad en cabritos con SDN	31
Figura 7. Frecuencia de inmunopositividad en corderos con SDN	32
Figura 8. Inmunopositividad a <i>Rotavirus</i>	33

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ABREVIATURAS

- **CEIEPAA:** Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano.
- **UNAM:** Universidad Nacional Autónoma de México.
- **FMVZ:** Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- **USEDICO:** Unidad de Servicios Diagnósticos y Constatación.
- **SDN:** Síndrome diarreico neonatal.
- **RVA:** *Rotavirus* tipo A.
- **RVB:** *Rotavirus* tipo B.
- **RVb:** *Rotavirus* bovino.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

INTRODUCCIÓN

El síndrome diarreico neonatal (SDN) se caracteriza por cuadros diarreicos donde están implicados muchos elementos, tales como la susceptibilidad animal, el estado nutricional, factores ambientales, manejo de rebaños y distintos agentes infecciosos virales (*Rotavirus* y *Coronavirus*), bacterianos (*Escherichia coli*, *Clostridium* spp, *Salmonella* spp) y parasitarios (*Cryptosporidium* spp), entre otros. El papel de los virus en el síndrome aún queda inexplorado y es probable que se pase por alto (Martella *et al.*, 2015), empero desde la última década se han reportado casos que identifican estos agentes mediante distintas técnicas diagnósticas; que van desde microscopía electrónica, inmunoensayos serológicos (ELISA) y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Distintos estudios reportan que la edad de presentación del SDN en corderos y cabritos por *Coronavirus* y *Rotavirus* varía desde los 0 días hasta los 3 meses de edad. Recientemente se reportó que puede presentarse antes de las tres semanas de edad (Ozmen *et al.*, 2018)

La etología y epidemiología del síndrome ha sido extensivamente estudiada en bovinos y cerdos. Muy pocos estudios han sido perfeccionados a investigar patógenos entéricos causantes de diarrea en corderos y cabritos recién nacidos (Muñoz *et al.*, 1996).

Estudios serológicos, e inmunohistoquímicos se han realizado en las últimas décadas, con el fin de evidenciar la participación viral de *Rotavirus* y *Coronavirus*, tomando en cuenta estudios retrospectivos en distintos países y realizados por microscopía electrónica para evidenciar las partículas virales (Tzipori *et al.*, 1978; Shabana 2017). La técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) es una técnica sensible que solamente se ha reportado para análisis y la posterior genotipificación de *Rotavirus*; estableciendo que en rumiantes las cepas identificadas más comúnmente pertenecen a *Rotavirus* A, pero en algunos estudios también se encuentran implicados los *Rotavirus* tipo B y C. Estudios han propuesto que posiblemente el *Rotavirus* tipo A es el responsable de infectar a pequeños rumiantes (Muñoz *et al.*, 1996). Aun así, estos estudios no dejan de lado los agentes bacterianos y parasitarios, con el fin de demostrar una posible sinergia o interacción, de *Coronavirus* y *Rotavirus* en asociación con *Cryptosporidium* spp que es uno de los agentes principales que causan diarreas en rumiantes, seguido de *Escherichia coli* y *Clostridium* spp (Berrios *et al.*, 1988, Mathews, 2016, Ozmen *et al.*, 2018).

En México se desconoce la importancia de *Coronavirus* y *Rotavirus* en el SDN en corderos y cabritos, sin embargo, se tienen estudios en los cuales se utilizó inmunohistoquímica para la identificación de *Rotavirus* y *Coronavirus* en terneros

(Pérez, 2016), Estableciendo el diagnóstico mediante la técnica de inmunohistoquímica en pequeños rumiantes, se pueden identificar a estos agentes virales y ayudaría para la implementación de medidas preventivas y terapéuticas, además de conocer algunos otros agentes implicados y la epidemiología de la enfermedad. Esto es importante ya que las pérdidas económicas que se dan por alta mortalidad de pequeños rumiantes en sus primeras semanas de vida son por medidas zootécnicas, preventivas y terapéuticas inadecuadas. La identificación de estos agentes virales podría ayudar a la implementación de vacunas en los hatos productivos en México.

ANTECEDENTES

El SDN en cabritos y corderos recién nacidos a un mes de edad, es una de las causas más comunes de alta morbilidad y mortalidad (Ozlem *et al.*, 2018). Hasta la década de los 80's los antecedentes de diarrea eran escasos; básicamente se asociaba el parasitismo por helmintos y coccidias. Nagy, *et al.*, (1984) menciona que la principal causa de diarrea en cabritos era por *Cryptosporidium* spp. Posteriormente fueron descritos otros agentes en relación con la diarrea neonatal como: *Rotavirus*, *Herpesvirus*, *Coronavirus*, *Adenovirus* y *Escherichia coli* (Berrios., *et al.* 1988). Las pérdidas económicas son debidas al deterioro en el crecimiento de los cabritos y corderos por la enteritis, los gastos involucrados en el tratamiento y su mayor mortalidad. Los *Rotavirus* y *Coronavirus* parecen ser los virus más comunes que causan enteritis en humanos y animales (Ozlem *et al.*, 2018). La enfermedad aguda debida a enteritis neonatal se caracteriza por una deshidratación progresiva, trastorno metabólico y la muerte, la cual ocurre en un periodo de 12 horas. En la forma subaguda de la enfermedad, la diarrea puede continuar durante varios días, lo que puede ocasionar malnutrición y pérdidas de peso. Los principios de la fisiopatología son los mismos que para enteritis neonatal de los terneros (Ozlem *et al.*, 2018).

Coronavirus

Son virus pleomórficos que varían en tamaño desde 70–200 nm de diámetro, con un promedio de 100-130 nm. Tienen una envoltura que contiene fosfolípidos, probablemente derivada en parte de la membrana de la célula huésped. Obtiene su nombre de “corona” (parecido al aspecto de una corona) por sus proyecciones radiales de la superficie en forma de pétalo o gota (peplómeros) (Gelberg, 2017; Uzal, 2017). Tienen un genoma de una hebra de RNA positiva, por tanto, pertenecen al grupo IV de la nomenclatura de Baltimore (Avendaño, 2012). Actualmente son miembros del orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae*; se subdivide además en cuatro géneros en función de las propiedades genéticas y serológicas: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus* (que

comprende 3 grupos: A, B, C), *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* (MacLachlan, 2017).

El *Betacoronavirus* es el género que más se ha estudiado en trastornos diarreicos en cabritos y corderos. En su cápside incluye una proteína de nucleocápside (N: 5060 kDa), una proteína transmembrana de triple tramo (M: 2335 kDa), una proteína transmembrana menor (E: 912 kDa) y una muy importante: el trímero de glucoproteína espiga (S: 180220 kDa por monómero) (MacLachlan, 2017). Esta última es responsable de la interacción entre el virus y el receptor celular, además de provocar anticuerpos neutralizantes (Bok *et al.*, 2018).

La glucoproteína S trimérica es una proteína transmembrana tipo I, con un gran ectodominio y endodominio muy corto. Es la más grande de las proteínas estructurales. Los monómeros individuales de la proteína se ensamblan en trímeros dando lugar a protuberancias en forma de mazo, que dan lugar a estructuras en forma de corona alrededor del virión. El ectodominio de la proteína S se puede dividir en dos dominios funcionales; el S₁, tiene propiedades de unión al receptor, que dentro de este se caracterizan 2 subdominios: el subdominio N-terminal (NTD) y el subdominio C. El primero, de algunos *Coronavirus* puede unirse a los carbohidratos como el ácido neuramínico acetilado 9-0 (*Coronavirus* bovino, BCoV), mientras que el subdominio C se une a los receptores proteínicos (Belouzard *et al.*, 2012).

El dominio S₂ contiene dos repeticiones de Heptad (HR), que se componen de una cadena de siete patrones de aminoácidos. Las repeticiones de Heptad representan una estructura definitoria de las proteínas de fusión viral de clase I, su conformación participa formando una estructura como bobina en espiral durante la fusión de membrana del hospedador (Chambers *et al.*, 1990).

Una característica peculiar de la proteína S, es que puede contener más de un sitio de escisión proteolítica. Los eventos de escisión que ocurren durante la biosíntesis o la entrada de *Coronavirus* consisten en activar dicha proteína mediante la participación de enzimas extracelulares (tripsina, furina) e intracitoplasmáticas, típicamente dentro de endosomas y lisosomas. Cada una de estas enzimas tiene actividad en escindir sitios de aminoácidos de la proteína espiga en diferentes eventos de la replicación (Kaoru *et al.*, 2015).

Patogenia

La replicación del virus es citolítica e inicialmente ocurre a lo largo de las vellosidades en todos los niveles del intestino delgado, y finalmente se disemina por todo el intestino grueso hasta el colon y recto (Uzal, 2017).

Al fusionarse, se replica en el citoplasma de enterocitos absorbentes en las puntas de las vellosidades y en sus lados. La replicación la llevan a cabo en el retículo endoplásmico rugoso, que posteriormente pasan a las cisternas del retículo endoplásmico liso y a túbulos del aparato de Golgi de la célula infectada. Los cambios se producen entre 12 a 24 horas después de la infección. Las mitocondrias en las células infectadas por virus se hinchan, las cisternas del retículo endoplásmico liso y rugoso se dilatan. Finalmente, el citoplasma pierde su densidad electrónica, generando degeneración y necrosis. El virus sale por exocitosis en la membrana apical o en la superficie basolateral.

Esto lleva a una exfoliación del epitelio dañado que puede ser masiva en un periodo de tiempo relativamente corto, lo que lleva al desarrollo de la atrofia de vellosidades, cuya gravedad refleja en gran medida el grado de infección viral inicial. Se observarán células columnares bajas, cuboides o escamosas poco diferenciadas, con microvellosidades irregulares y aplastadas; estas son incapaces de absorber nutrientes y liberar enzimas digestivas y por tanto se rompe el flujo digestión-absorción. Las vellosidades pueden aparecer fusionadas a lo largo de sus lados o en las puntas debido a la adhesión de la lámina propia temporalmente ausente de enterocitos (Gelberg, 2017), a menudo las vellosidades son puntiagudas (Uzal, 2017). La inflamación puede ser focal en la lámina propia de las vellosidades expuestas, principalmente de tipo mononuclear que colapsan las vellosidades. Finalmente, aunque pueden ocurrir varios ciclos de replicación viral, los enterocitos pobremente diferenciados parecen relativamente refractarios a la infección, y el título del virus disminuye, a medida que también intervienen mecanismos inmunitarios locales.

La hiperplasia del epitelio en las criptas generalmente resulta en la resolución final de la atrofia de las vellosidades para compensar la función normal. La diarrea que se produce es el resultado de una mala absorción de electrolitos y nutrientes, con cierta contribución por la secreción de las células de la cripta, y por un epitelio de superficie pobremente diferenciado en la fase de regeneración y reparación (Gelberg, 2017 y Ozmen *et al.*, 2018). La desaparición de los signos se produce de 4 a 6 días aproximadamente, a medida que se produce la regeneración de las vellosidades, siempre que el animal sobreviva a la deshidratación, el agotamiento de los electrolitos y la acidosis metabólica provocada por la diarrea (Ozmen *et al.*, 2018). Los animales sistémicamente cursan con deshidratación posteriormente mueren por choque hipovolémico (Christine, 2012) (Figura 1).

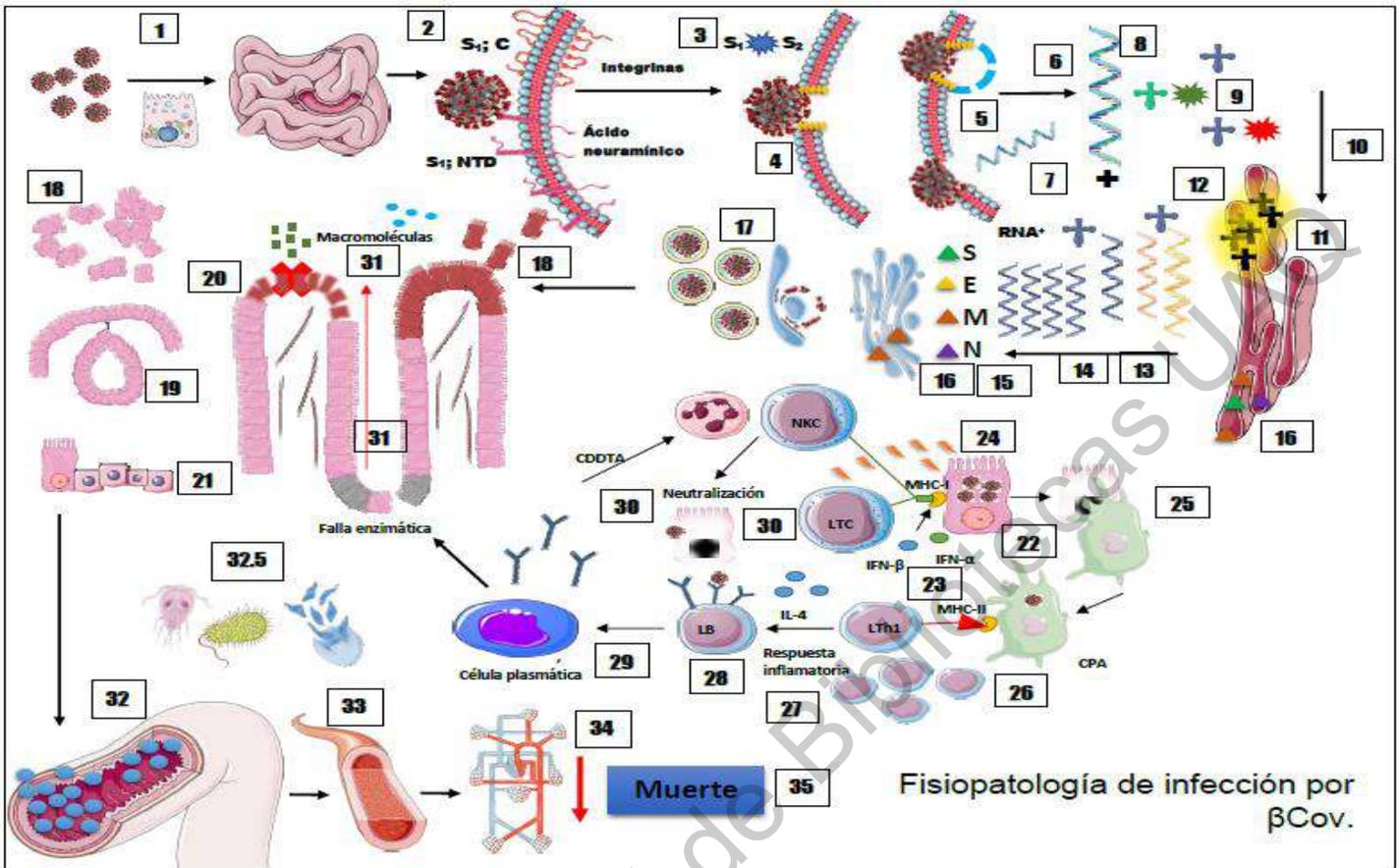


Figura 1. Fisiopatología de Coronavirus.

El virus se transmite por heces o secreciones y esputo. Puede permanecer durante 2 a 3 días en superficies secas a temperatura ambiente y de 2 a 4 días en las heces. (1) El virus pasa intacto en el abomaso, el ácido clorhídrico no lo desnaturaliza, porque es un virus envuelto; debido a esto, la entrada del coronavirus en la célula objetivo en el intestino requiere completar con éxito dos pasos críticos: (2) el primero, unirse a la superficie celular mediante el trímero de glucoproteína espiga (S); cuenta con un endodominio (interno) y ectodominio (externo), éste último se divide en dos dominios funcionales; el dominio S₁ responsable de la adsorción viral que a su vez se divide en dos subdominios; el dominio N-terminal (NTD) que se une a los carbohidratos como el ácido neuramínico acetilado 9-0, mientras que el subdominio C se une a receptores proteínicos tales como integrinas. Para que esto suceda, (3) es importante la participación de enzimas intracitoplasmáticas, extracitoplasmáticas o de la membrana a las cuales son afines a aminoácidos de las cadenas de S espiga "escindiéndola" en particulares sitios entre S₁ y S₂, modificando la estructura proteínica para así pasar al segundo paso crítico: (4) que es la fusión de la envoltura viral con las membranas celulares dada por el dominio S₂ que contiene 2 repeticiones de una cadena de 7 patrones de aminoácidos con extremos hidrófobos (isoleucina, leucina, fenilalanina); (5) forman una estructura de bobina en espiral durante la fusión de la membrana viral y celular; (6) estructurando un endosoma; que acarreará al virus, hasta liberarlo en el citoplasma, también otra vía (7) es solo la fusión y liberación de material genético sin utilización de endosoma. La mecánica de ambas vías dependerá de la modificación de la proteína S espiga, dada por el sitio de escisión de enzima.

(8) La cadena de RNA⁺ funciona como RNA mensajero que se traduce en una poliproteína (9) que es escindida en proteínas no estructurales en el retículo endoplásmico rugoso. (10) Una de las proteínas resultantes es la polimerasa dependiente de RNA; se escinde por proteasas no estructurales y (11) da como resultado productos maduros nsp1 y nsp16 (no estructural), estas se ensamblan en las membranas del RER, para formar el complejo de la transcriptasa-replicasas activa. (12) La polimerasa viral se usa para sintetizar ARN⁺ (complementario) de longitud completa. (13) El anti-genoma se copia nuevamente en ARN⁺ de longitud completa, (14) se replica por el sitio replicasa de polimerasa viral para generar RNA genómico de longitud completa. (15) Comienza la recombinación tras numerosas copias de RNA anidado que se replican en RNA^m subgenómicos traduciendo a proteínas estructurales (S, E, M, N), la (16) proteína M se dirige a las cisternas del RER, REL y otras a membranas del aparato de Golgi; dañando las cisternas, las cuales se distienden y fallan los componentes de traducción de proteínas, insuficiente movimiento por ausencia de Ca²⁺ y las mitocondrias se hinchan y hay pérdida de energía; los cambios en la célula infectada se producen entre 12 a 24 horas después de la infección; degeneración celular, pérdida de la arquitectura y necrosis. (17) Los viriones se ensamblan y se liberan desde REM, REL y del aparato de Golgi hacia la membrana citoplasmática de la célula, finalmente se liberan por exocitosis. Después de su liberación muchos de los virus envueltos permanecen adheridos al exterior de la célula, además las proteínas de espiga se asocian juntamente con proteína M, donde se expresan en la superficie celular, donde pueden desencadenar una fusión celular extensa dando como resultado sincitios.

En las vellosidades los enterocitos degenerados pierden las uniones basolaterales y con la lámina propia. (18) Los enterocitos se desprenden en forma excesiva y sobreaguda, consecuentemente (19) dejan la lámina propia expuesta de varias vellosidades y estas se fusionan entre sí, se vuelven irregulares, y se acortan. (20) Los enterocitos necróticos y los exfoliados deben ser reemplazados desde la base de las criptas, el exceso de daño llega a rebasar la capacidad de regeneración (21) generando enterocitos inmaduros y de morfología cilíndrica a cuboidal o escamosa (atenuación epitelial). (22) Las células infectadas estimulan la producción de IFN-α, IFN-β, éste último (23) favorece la expresión de moléculas MHC-I, (24) las células NK identifican esta alteración, liberando sus enzimas y desnaturalizando, sin embargo (25) los histiocitos fagocitan los fragmentos necróticos y partículas virales que después son procesados para la presentación de antígeno. (26) activan a linfocitos T_{H1} mediante la unión de MHC-II. (27), liberan IL-4 que promueve la llegada de más células inflamatorias. (28) Los linfocitos B son activados por la unión antígeno (partícula viral) anticuerpo, (29) se activan convirtiéndose en células plasmáticas y liberando anticuerpos. (30) Que potencia la citotoxicidad mediada por anticuerpo de neutrófilos, linfocitos CD8⁺, NK e histiocitos.

(31) Por pérdida de enterocitos absorbentes, y enterocitos productores de enzimas, el flujo digestión absorción se interrumpe (32) desarrollando diarrea por mala absorción e hipersecretora debido a que la cantidad de solutos en la luz intestinal implica mayor movilidad de agua y electrolitos a la misma. Los macronutrientes se fermentan en el intestino grueso y esto agrava el cuadro. (32.5) En la mayoría de los casos comienzan asociaciones con otros agentes patógenos que agravan el cuadro. (33) En forma sistémica por la pérdida de líquidos hay deshidratación, a nivel vascular hay hemoconcentración, (34) cursando con hipovolemia sistémica que en forma grave (35) muere por choque hipovolémico aunado a la desnutrición por pérdida de nutrientes, genera debilidad y los animales no pueden moverse a comer (imagen diseñada por Maximiliano Ruiz).

Lesiones macroscópicas y microscópicas

Las lesiones macroscópicas producidas en las enteritis por *Coronavirus* son indistinguibles de las causadas por *Rotavirus*. El intestino delgado y grueso están dilatados y con moderado contenido amarillento. Se ha observado microscópicamente que la enteritis coronaviral comienza en el intestino delgado proximal con enteritis linfoplasmocítica, acortamiento y atrofia de vellosidades, desprendimiento epitelial, e hiperplasia de criptas (Uzal, 2017). En terneros, se disemina al epitelio intestinal del colon, progresivamente va disminuyendo en yeyuno cuando se extienden a intestino grueso, observándose inmunopositividad mediante inmunohistoquímica en enterocitos, colonocitos e histiocitos (Park, *et al.*, 2007). Siendo las lesiones patológicas comunes en el colon espiral, dan lugar a colitis que se caracteriza clínicamente por sangre y el moco en heces (Ozlem *et al.*, 2018).

Las enfermedades por *Coronavirus* crean problemas a cualquier edad, pero especialmente rumiantes jóvenes van de 4 a 30 días de edad (Ozmen *et al.*, 2018).

Antecedentes

Cuadro 1. Estudios que identificaron *Coronavirus* en borregos y cabras por diferentes técnicas diagnósticas.

Autor	Región	Estudio	Hallazgo	Total, animales
Tzipori <i>et al.</i>, 1978; Pass <i>et al.</i>, 1982	Australia	Microscopia electrónica en heces	Solo un animal se observó la presencia viral	*8 muestras
Trávén <i>et al.</i>, 1999	Suecia	ELISA; en suero	Prevalencia: 19% (41 borregas)	**218 borregas.
Shabana <i>et al.</i>, 2017.	Arabia Saudita	ELISA; en heces.	Incidencia: 19.6% (38) en corderos y 16.2% (19) en cabritos.	*193 corderos 117 cabritos.
Ozlem <i>et al.</i>, 2018.	Turquía	Inmunohistoquímica	6.6% de inmunopositividad	*15 corderos 15 cabritos.

*Animales que cursaban con diarrea.

Rotavirus

Es el principal patógeno viral entérico de los seres humanos y de una amplia variedad de animales. Las presentaciones clínicas varían desde una infección asintomática, hasta una diarrea aguda que puede llevar a la muerte debido a una deshidratación grave y otras complicaciones (Cook *et al.*, 2004 y Papp, *et al.*, 2014).

Es un virus icosaédrico desnudo de 70-75 nm, pertenece a la familia *Reoviridae*. La cápside viral tiene tres capas (una doble cápside externa, una interna) y un núcleo que contiene un genoma de ARN de doble cadena; una de polaridad positiva y otra de polaridad negativa, por tanto, pertenece al grupo III según la clasificación de Baltimore (Avendaño, 2012). El genoma consiste en 11 segmentos; los cuales cada uno codifica al menos a 6 proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP5, VP6, VP7) y 5 o 6 proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5) (Papp, *et al.*, 2014). Las proteínas no estructurales están asociadas con la replicación del virus, la traducción, la respuesta inmune innata del huésped y la morfogénesis (Chen, *et al.*, 2018).

El nombre de *Rotavirus* se sugirió por el aspecto característico de una rueda con un contorno circular bien definido de la cápside externa y radios cortos, cuando se examinó mediante microscopía electrónica de tinción negativa (Flewett *et al.*, 1974)

Se ha utilizado ampliamente un sistema de clasificación binaria para las cepas de *Rotavirus*, que se basa en la configuración de los antígenos de la cápside externa, tipos G por el término “glucoproteína” que corresponde a la proteína VP7 y los tipos P por el término “proteasa sensible”, propio de la proteína VP4. La parte interna, el *core* está constituida principalmente por VP2 y al interior se encuentra VP1 y VP3 unidas tanto VP2 como a cada uno de los 11 segmentos de RNA. VP1 y VP3 son responsables de la síntesis de RNA, durante el inicio de la infección y también en las etapas tardías de la replicación del genoma (Papp *et al.*, 2014). La proteína VP6 es la más abundante en la partícula viral; se ubica en la cápside media; siendo la que se usa para la clasificación del tipo, grupo o especie (Uzal, 2017), de los cuales se dividen en A, B, C, D, y E, e históricamente 2 adicionales F y G. Se ha encontrado que RVA, RVB, RVC y RVE infectan varias especies animales y humanos; mientras que RVD, RVF y RVG se ha aislado solo en aves. En los rumiantes las especies más comúnmente identificadas pertenecen a RVA, pero en algunos entornos, la RVB y la RVC también se encuentran frecuentemente e implican en la diarrea grave, particularmente en corderos y cabritos (Muñoz *et al.*, 1996; Papp *et al.*, 2014).

Los grupos que se han identificado en corderos son *Rotavirus* tipo A y B (Gazal *et al.*, 2011). Generalmente varias especies afectan a los rumiantes, esto se debe a que son capaces de formar nuevas cepas por un mecanismo de reordenamiento. La redistribución puede ocurrir cuando dos *Rotavirus* de dos cepas diferentes infectan la misma célula, y durante la replicación y el empaquetamiento intercambian segmentos del genoma (Cook *et al.*, 2004).

El esquema de clasificación de cepas, basado en 11 genes recientemente adoptados por el grupo de trabajo de clasificación de *Rotavirus* (RCWG) ha demostrado ser útil para delinear el origen y la evolución de las cepas identificadas en diversas especies animales. El esquema se basa en valores de corte de identidad de secuencia de nucleótidos de cada gen viral, donde el esquema Gx-P [x] -Ix-RxCx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx designa la constelación de genotipos de la VP7–VP4 – VP6 – VP1 – VP2 – VP3 – NSP1– NSP2 – NSP3 – NSP4 – NSP5 / 6 genes, respectivamente (Matthijssens J *et al.*, 2008).

Los *Rotavirus* infectan los enterocitos absorbentes, células caliciformes, enterocitos de las criptas, ocasionalmente en la mitad distal o dos tercios de la vellosidad en el intestino delgado. En los rumiantes en la mitad apical de las células es donde más se puede localizar. La producción de virus y la fisiopatología es similar a las otras especies que afecta. Sin embargo, estudios han encontrado presencia antigénica en secciones de riñón, hígado y pulmones utilizando modelos murinos inoculados con *Rotavirus* tipo A (Kashyap *et al.*, 2018).

Patogenia

Los *Rotavirus* se adhieren a los receptores celulares de ácido siálico, mediante la utilización de las proteínas VP4 y VP7, para posteriormente interactuar con algunas integrinas ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha X\beta 2$, $\alpha V\beta 3$) así como la proteína de choque térmico (hsc70). No todos los tipos interactúan con las integrinas, mientras que todas las cepas probadas requieren hsc70, que está mediada por VP5. Por tanto, la presencia de hsc70 determina una infección celular eficiente.

El virus posteriormente se internaliza por endocitosis dependiente de caltrina o caveolina, se ha establecido que la proteína VP4 determina la ruta endocítica. Al internalizarse, viaja a lo largo del aparato de vesículas intracelulares que se mueve desde la periferia celular, al espacio perinuclear, secuestrando la red endosomal; que forma endosomas tempranos, maduros y tardíos. Estos se caracterizan por tener un pH luminal, proteínas y lípidos, que permiten la motilidad, la fusión de vesículas, también llamadas proteínas efectoras. La unión de Rab5, EEA1 y ESCRT en el endosoma determinan un endosoma temprano, posteriormente se forman vesículas intraluminales (ILV) estableciéndose un

endosoma maduro. Finalmente, la formación de un endosoma tardío depende de la unión de proteínas Rab9 y Rab7, donde la primera permite la activación del complejo proteínico M6PR's que se encuentra en el complejo de Golgi, movilizando lisosomas para su posterior unión con el endosoma tardío y desestabilizar la membrana para que el virus pueda salir. Se ha estudiado que posiblemente hay algunos virus que a partir de la formación de endosoma tardío pueden liberar las partículas virales por la actividad de la proteína VP4, que realiza un cambio en la conformación por la activación de calcio que éste permite desestabilizar la membrana del endosoma para posteriormente comenzar el desnudamiento viral (Arias, 2016). Su replicación es monocistónica e incluye los genomas individuales y segmentados. Su cápside externa se pierde y se libera en el citoplasma el RNA; activando la transcriptasa asociada al virión y las síntesis macromoleculares virales (Avendaño, 2012). Los virus salen de la célula por exocitosis, tomando parte de la cápside del RER, REL, y complejo de Golgi, finalmente el virus infectante es aquel que cuenta con las tres capas (Uzal, 2017).

La patogenia de la diarrea con *Rotavirus* involucra cuatro mecanismos:

1. Malabsorción: la infección de la célula huésped, que se caracteriza por una serie de interacciones virus-célula dependiente Ca^{2+} (Ruiz *et al.*, 2000). Una vez que se liberan las proteínas no estructurales como NSP4, se inicia eventos intracelulares tales como la liberación excesiva de Ca^{2+} , que desencadena una serie de procesos celulares como la interrupción de la red del citoesqueleto de las microvellosidades, la expresión reducida de las disacaridasas y otras enzimas en la superficie apical, la inhibición que generan los sistemas de cotransporte de Na^+ y finalmente necrosis. NSP4 parecen ser liberadas específicamente por una vía de secreción no clásica dependiente de Ca^{2+} antes de la lisis celular. La función de la fosfatasa alcalina, la lactasa, la sacarasa y la maltasa se reducen, llevando el bolo sin digerir hacia el intestino grueso y éste tras la incapacidad de absorber agua acentúa el cuadro (Uzal, 2017; Ramig, 2004). Asimismo, el exceso de regeneración de enterocitos por células de la cripta reduce la generación de enzimas para la digestión y absorción, dando como resultado la acumulación de lactosa que posteriormente se fermenta y estimula la secreción de líquidos (Snodgrass *et al.*, 1977).

La liberación de NSP4 de las células infectadas permite que se produzcan efectos paracrinos en las células no infectadas. NSP4 se une a estas células mediante el uso de receptores específicos no identificados, desencadenando una cascada de Fosfolipasa C-inositol 1,3,5 trifosfato (PLCIP3) que culmina en la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico, aumentando la movilidad de moléculas intracelulares y alterando el equilibrio de iones. Se sugiere que hay aumento en Na^+ y una disminución en K^+ , lo que parece estar relacionado con un aumento de

la permeabilidad de la membrana plasmática y no con la inhibición de la bomba Na^+/K^+ . Los cambios en los niveles de Na^+ y K^+ podría afectar la absorción electro neutra de NaCl y por tanto la absorción de nutrientes ligados a Na^+ dando como resultado una pérdida de líquido (Ramig, 2004).

2. Hipersecreción: se debe a la desregulación de Na^+ , y puede estar relacionada con una inhibición general de los sistemas de cotransporte de Na^+ . NSP4 actúa sobre las células de la cripta, el incremento de Ca^{2+} intracelular conduce a la secreción de agua y electrolitos en la cripta mediada por la activación de un cotransportador Cl^- , lo que resulta en un aumento del componente secretor de la diarrea (Ramig, 2004).

3. Hipermotilidad: La NSP4 secretada, u otras moléculas efectoras liberadas de las células infectadas, también pueden activar al sistema neuroentérico (ENS). De hecho, los experimentos con agentes que bloquean la función del ENS demostraron que la infección por *Rotavirus* induce la secreción mediante la estimulación de este que puede llevar a la hipermotilidad. Aún no se conoce como funciona el estimulador molecular de la motilidad, ya que quien regula la motilidad es este sistema. Sin embargo, el tiempo de tránsito intestinal disminuye durante la infección por *Rotavirus*, lo que implica un aumento de la motilidad (Ramig, 2004).

Si NSP4 actúa sobre los enterocitos, tiene como resultado la interrupción de las uniones estrechas, aumento de la permeabilidad paracelular y desprendimiento de enterocitos. La disminución de la resistencia transepitelial inducida por el virus y la NSP4, sugiere que la infección puede causar una fuga paracelular dejando expuesta la lámina propia. Los enterocitos se pueden unir con sus vecinos, evolucionando con fusión de las vellosidades. El *Rotavirus* también induce a las células epiteliales intestinales a secretar quimiocinas: IL-8, IFN, Proteína estimulada 10 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos). Además, los niveles de PGE_2 aumentan en el intestino contribuyendo al incremento de la motilidad intestinal. Las quimiocinas pueden activar la respuesta inmune en lugar de contribuir directamente a la diarrea. (Ramig, 2004).

4. Isquemia local de vellosidades: La diarrea puede deberse a la liberación de un agente vasoactivo del epitelio infectado inducido por el virus, causando una isquemia local de vellosidades y un daño funcional posterior de los enterocitos. Sin embargo, la isquemia de vellosidades solo se ha observado en ratones, se desconoce en otras especies (Ramig, 2004). Los animales sistémicamente cursan con deshidratación y posteriormente mueren por choque hipovolémico aunado a la debilidad debida a la desnutrición por la incapacidad de absorción (Christine, 2012). (Figura 2).

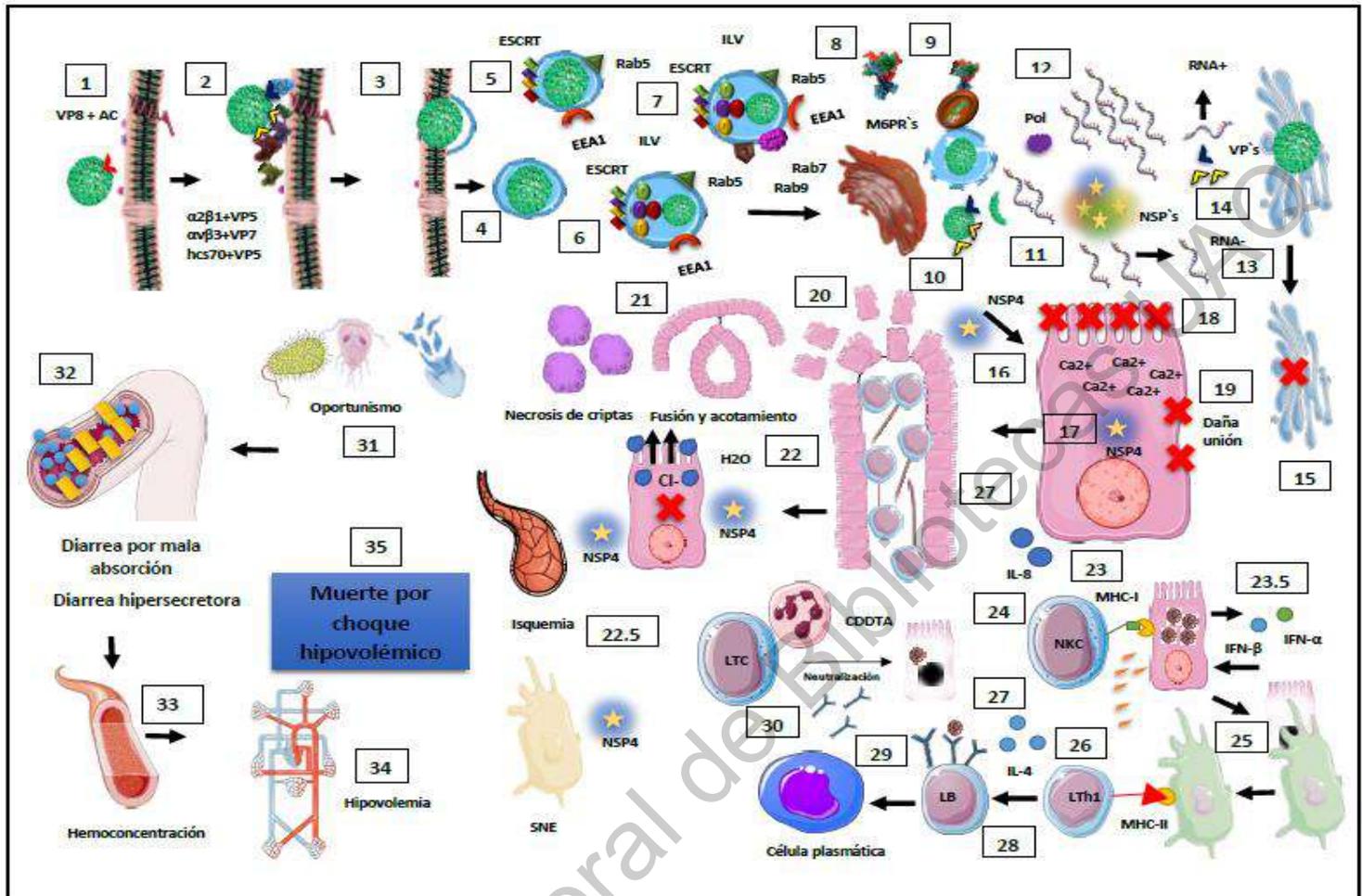


Figura 2. Fisiopatología de Rotavirus.

El virus se transmite por vía oro fecal. Puede permanecer hasta 4 meses en heces de animales a temperatura ambiente. (1) La adsorción a la célula blanco, se lleva a cabo por la unión de hendidura ancha de la proteína VP8 (VP4 activada) a ácidos siálicos de cadenas sub-terminales de la célula. (2) Después de la unión inicial a los glucanos, la integrina $\alpha 2\beta 1$ celular, se une al dominio de VP5 viral, por otro lado, la integrina $\alpha V\beta 3$ interactúa con la secuencia lineal de VP7. VP8 (VP4 activada) puede abrir las uniones estrechas liberando proteínas basolaterales (integrinas $\alpha V\beta 3$, $\beta 1$ y $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$, JAM-A, occludina y ZO-1. Sin embargo, la unión quizá más importante y que todas las cepas desarrollan es la que tiene la proteína VP5 con la proteína relacionada del choque térmico 70 (hsc70) de la célula. (3) La fusión e internalización esta mediada por VP4; se internaliza por endocitosis dependiente de clatrina o mediada por caveolas, así como macropinocitosis. (4) El virus secuestra la red endosomal. (5) Comienza como un endosoma temprano, por la unión de la proteína Rab5 (controla identidad de membrana, motilidad y fusión con otras vesículas), unión de maquinaria ESCRT (regula cascada abajo del receptor y brotación retroviral) y EEA1 (regula movimiento). (6) Después de la maquinaria proteínica ESCRT regula la formación de vesículas intraluminales ILV (silencian expresión de VPSA4A, la ATPasa asociada a ESCR involucrada a fusión de membrana, además de inducir un cambio conformacional en el virus para poder salir), convirtiéndose en endosoma maduro. (7) El endosoma tardío, se forma por la unión de Rab7 (evita la liberación del virus y lo mantiene estable), GTPasa Rab9 (8) (organiza el transporte de los receptores de manosa-6-fosfato (M6PRs) desde el endosoma tardío, hasta el complejo de Golgi. (9) Los M6PRs, administran las hidrolasas ácidas lisosomales, desde la red trans-Golgi, a los endosomas tardíos. (10) Al salir del endosoma, la proteína VP4 experimenta un cambio conformacional para iniciar una secuencia en cascada, junto por VP7 y VP5 para desestabilizar la nucleocápside. (11) En el retículo endoplásmico rugoso el material genético es liberado en conjunto con las proteínas no estructurales, y la RNA polimerasa (transcriptasa) viral. (12) La cadena de RNA⁺ es transcrita por la polimerasa viral (transcriptasa) en muchas cadenas de RNA⁺. (13) La RNA polimerasa (transcriptasa) utiliza las cadenas de dsRNA⁺ como plantillas. Algunas de las plantillas se transcriben para formar mRNA y que sirva de molde para generar la hebra de RNA⁺ genómico viral. Algunas plantillas, forman las proteínas no estructurales que junto al RNA⁺ formar precapsides. (14) Finalmente, el RNA genómico viral traduce las proteínas estructurales. (15) Los viriones adquieren su cápside completa en el RER; se dilatan y alteran las funciones básicas como traducción de proteínas esenciales, precipitando a falla celular progresiva. (16) El daño principal está dado por una de las proteínas no estructurales, que funciona como toxina; la NSP4, que (17) estimula la liberación de Ca²⁺ intracelular, (18) irrumpiendo la red de transporte de citoesqueleto de las microvellosidades, por tanto no hay absorción; además de la inhibición de enzimas para la digestión y fallos en los sistemas de transporte de Na⁺, (19) así también, alteración de proteínas de uniones basolaterales que son dependientes de calcio; permitiendo alteración en la membrana plasmática, precipitando en degeneración, necrosis y (20) desprendimiento epitelial. (21) Las vellosidades sufren fusión y acortamiento, además hay regeneración epitelial de las criptas y puede sobrepasar su capacidad, observándose enterocitos inmaduros incapaces de secretar enzimas. Los enterocitos llegan a ser cúbicos o planos (atenuación). (22) En las células de las criptas, NSP4 afecta el cotransportador de Cl⁻, por aumento de Ca²⁺, que conduce a la salida de agua. Observándose diarrea hipersecretora. (22.5) También, NSP4 se ha reportado que daña directamente el sistema neuroenterico; observándose hipermotilidad, además de isquemia local de vellosidades. (23) La liberación de quimiocinas, una de ellas, es la IL-8, que atrae linfocitos, (23.5) aunado, con la liberación de Interferones por la misma célula infectada, para modificar la expresión de MHC-I. (24) Las células NK que identifican a las células infectadas mediante el MHC-I alterado, liberan sus enzimas y eliminan las células infectadas. (25) Por otro lado, los histiocitos fagocitan los fragmentos necróticos y partículas virales, que después son procesados para la presentación de antígeno. (26) Activan a linfocitos T_{H1} mediante la unión de MHC-II y estos liberan IL-4, (27) que promueve la llegada de más células inflamatorias. (28) Los linfocitos B son activados por la unión antígeno (partícula viral) anticuerpo. (29) se activan convirtiéndose en células plasmáticas, liberando anticuerpos. (30) Los cuales potencian la citotoxicidad mediada por anticuerpo (CDDTA) de neutrófilos, linfocitos CD8⁺, NK e histiocitos. (31) En la mayoría de los casos comienzan asociaciones con otros agentes patógenos que gravan el cuadro diarreico. (32) En forma sistémica, por la pérdida sobregada de líquidos, el animal cursa con deshidratación, a nivel vascular hay (33) hemoconcentración, cursando con (34) hipovolemia sistémica que en forma severa (35) muere por choque hipovolémico, aunado a la desnutrición por pérdida de nutrientes; debilidad, inanición, los animales no pueden moverse a comer ni tomar agua (imagen diseñada por Maximiliano Ruiz).

Lesiones macroscópicas y microscópicas

Las lesiones macroscópicas producidas por *Rotavirus* pueden ser indistinguibles por las causadas por *Coronavirus* y *Escherichia coli* Enterotoxigénica. Estas pueden variar dependiendo de la gravedad del daño viral inicial y la etapa de evolución de secuelas (Uzal, 2017). Las secciones de intestino delgado se encuentran dilatadas y con moderada cantidad de contenido intestinal (Gelberg, 2017), así también las asas intestinales están congestionadas en forma difusa (Snodgrass *et al.*, 1977). *Rotavirus* no presenta lesiones macroscópicas y microscópicas en intestino grueso (Uzal, 2017). Las lesiones microscópicas tales como la metaplasia de epitelio cilíndrico a cuboidal, fusión de vellosidades son hallazgos comunes. Sin embargo, las lesiones histopatológicas de casos positivos de *Rotavirus* revelaron que son frecuentes las zonas de degeneración vacuolar de las células epiteliales, principalmente en las puntas de las vellosidades, y necrosis de las criptas en el yeyuno. Se observó también degeneración en las células epiteliales del íleon. Las lesiones se localizaron principalmente en el intestino delgado y se produjeron leves reacciones inflamatorias en la lámina propia (Ozlem *et al.*, 2018). El infiltrado inflamatorio que lo compone es principalmente de linfocitos y células plasmáticas (Uzal, 2017). Snodgrass *et al.*, (1977), reportan infiltrado de tipo eosinofílico y células mononucleares, que conforme avanzaban las lesiones se observaron abundantes neutrófilos.

Antecedentes (Cuadro 2).

Cuadro 2. Estudios donde identificaron *Rotavirus* en borregos y cabras por diferentes técnicas diagnósticas.

Autor	Región	Estudio	Hallazgo	Total, animales
Theil et al., 1995.	EUA	ME: muestras fecales	<i>Rotavirus</i> tipo B en heces	*6 cabritos.
Kaminjolo et al., 1994.	Trinidad y Tobago	Aglutinación en látex, muestras fecales	Prevalencias: 48.3% (18 borregos) y 28.6% (2 cabras) RVA	* 37 borregos; 7 cabras
Muñoz, et al., 1996.	España	ELISA; muestras fecales	Prevalencia de 2.1 % (3 corderos) RVA; 8.1% (3 cabritos) RVA y 13.5% (5 cabritos a RVB	*146 corderos 36 cabritos
Dey, et al., 2007.	Bangladesh	Electroforesis y tinción con plata (PAGE-ss); muestras fecales	Detección del 8.68% (42 cabritos)	*485 cabritos
Shabana, et al., 2017.	Arabia Saudita	ELISA; en heces	Prevalencia del 31.6% (61 corderos) y 27.4% (23 cabritos) RVb	*193 corderos y 117 cabritos
Singh et a., 2017	India	ELISA, RT-PCR Electroforesis y tinción con plata (PAGE-ss); muestras fecales	Prevalencia del 8% (10 cabritos) y 5% (5 corderos) por RVA	*100 corderos y 125 cabritos.
Ozlem et al., 2018.	Turquía	Inmunohistoquímica	Prevalencia del 33% en corderos y cabritos	*30 animales en total; 15 cabritos y 15 corderos.

*Animales que cursaban con diarrea.

Infecciones mixtas

Hay varios informes disponibles sobre los agentes etiológicos de la enteritis neonatal en corderos y cabritos, pero la mayoría de ellos se basan en la detección del agente infeccioso en las heces mediante inmunoensayos, mientras que algunos en la microscopía electrónica en muestras de heces (Muñoz et al., 1996; Eisa y Mohamed, 2004). El síndrome diarreico neonatal en pequeños rumiantes se ha encontrado influenciado por distintos patógenos, en los que destaca por su incidencia *Cryptosporidium parvum* (Ozlem et al., 2006). Sin embargo, cuando se habla de las lesiones y como se ha mencionado, es difícil diferenciar de *Rotavirus* y *Coronavirus*, así como *Escherichia coli*. Estudios en España han reportado infecciones mixtas en el 15% de los corderos y en el 39% de cabritos; de 190 y 36 muestras fecales respectivamente, siendo la combinación más común *Cryptosporidium parvum* con *Escherichia coli*. También se detectaron *Rotavirus* del tipo A con *Cryptosporidium parvum*, *Rotavirus* del tipo A con *Escherichia coli*. Sin embargo, no se encontró asociación estadísticamente significativa entre a presencia de cualquier infección mixta y diarrea en corderos y cabritos (Muñoz, et al., 1996). Las infecciones experimentales con ETEC, *Rotavirus* y *Cryptosporidium parvum* sugieren poca sinergia entre estos enteropatógenos (Barrios, et al., 1988). En un estudio que reportó la diversidad de *Escherichia coli* patógena y no patógena de terneros con diarrea presentaron diferencias de su diversidad de *Phylum* con un perfil diferentes para fimbrias y resistencia a los antimicrobianos, lo que confirmó los cambios de *Escherichia coli* como comensal durante la infección intestinal por virus (Maciel, et al., 2019).

HIPÓTESIS

Demostrar la presencia de *Coronavirus* y *Rotavirus* por medio de inmunohistoquímica, en el intestino de cabritos y corderos con síndrome diarreico en el altiplano mexicano.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de *Coronavirus* y *Rotavirus* en el síndrome diarreico en corderos y cabritos del altiplano mexicano.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Hacer un estudio retrospectivo de necropsias de los casos con síndrome diarreico en corderos y cabritos remitidos al laboratorio de patología de la USEDICO.
2. Identificar las lesiones sugerentes de *Coronavirus* y *Rotavirus* y evaluar su gravedad en cortes de intestino de corderos y cabritos.
3. Estandarizar y aplicar la técnica de inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales anti β *Coronavirus* y *Rotavirus*, en secciones de intestino de corderos y cabritos.
4. Analizar los resultados obtenidos por inmunohistoquímica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Declaración de ética

El trabajo fue realizado en su mayor parte en la Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación (USEDICO) del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), ubicado en la comunidad de Santillán, Municipio de Tequisquiapan del Estado de Querétaro. La técnica de Inmunohistoquímica (IHQ) para *Coronavirus* se realizó en el Departamento de Patología, de la FMVZ de la UNAM en la Ciudad de México.

El trabajo fue financiado por el proyecto PAPIME PE215418. Mejoramiento del bienestar animal en rumiantes que se emplean en la formación de médicos veterinarios zootecnistas en un centro de enseñanza de la FMVZ-UNAM.

Estudio retrospectivo

Se seleccionaron casos de necropsias de corderos y cabritos de 0 días a 120 días con semiología de diarrea, remitidos a la USEDICO. Se realizó una base de datos que incluyó fecha de ingreso, número de caso, raza, edad, género, animales externos e internos, causa de muerte/diagnóstico definitivo, lesiones macroscópicas/microscópicas, estudios complementarios, causa de muerte y lesiones encontradas en otros órganos.

De los casos seleccionados, se obtuvieron los cortes de intestino teñidos con hematoxilina y eosina. Se consideraron como criterios de inclusión las lesiones histopatológicas como: enteritis linfoplasmocítica, fusión de vellosidades, acortamiento de vellosidades, atenuación epitelial, necrosis de criptas, necrosis de vellosidades y desprendimiento epitelial. Se descartaron las lesiones no asociadas a los agentes virales y casos con avanzados cambios autolíticos.

Gradificación de lesiones microscópicas

Se evaluaron siete lesiones microscópicas: enteritis linfoplasmocítica, acortamiento y fusión de vellosidades, atenuación epitelial, necrosis de criptas, necrosis de vellosidades, desprendimiento epitelial. De cada una de estas variables se estableció el valor de la gravedad (1 al 3; 1: ligera, 2: moderada y 3: grave) con base en el porcentaje de extensión (Cuadro 3).

Cuadro 3. Definición de las categorías de la gravedad de lesiones microscópicas.

Lesión	Definición	Valor
Enteritis linfoplasmocítica	10 – 25% ligera* 26 – 50% moderada >50% (denso) grave	Ligero: 1
Fusión de vellosidades	10 – 25% ligera 26 – 50% moderada >50% grave	
Acortamiento de vellosidades	10 – 25% ligera 26 – 50% moderada >50% (denso) grave	
Atenuación epitelial	10 – 25% (cúbica) ligera 26 – 50% (cúbica – escamosa) moderada >50% (escamosa) grave	Moderado: 2
Necrosis de criptas	10 – 25% ligera 26 – 50% moderada >50% grave	Grave: 3
Necrosis de vellosidades	10 – 25% ligera 26 – 50% moderada >50% grave	
Desprendimiento epitelial	10 – 25% ligera 26 – 50% moderada >50% grave	

* Los porcentajes se refieren al área de intestino afectada. Tomado de: *Erben U, et al. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. 2014.*

Se obtuvieron los tejidos incluidos en parafina de los casos que cumplieron con los criterios de inclusión y se tomaron alícuotas con sacabocados de 0.8 mm de diámetro que incluían intestinos con las lesiones. Se reincluyeron en parafina,

mediante en casetes de plástico. Posteriormente se realizaron dos cortes de 3 μm con el empleo de un microtomo y se colocaron en laminillas electrocargadas¹ con ayuda del baño de inmersión para su posterior aplicación de la técnica de IHQ, una para *Rotavirus* y la otra para *Coronavirus*.

Método de inmunohistoquímica

Estandarización de la prueba de inmunohistoquímica para Rotavirus por la técnica de estreptoavidina peroxidasa

- En cada procedimiento se utilizó un testigo negativo y uno positivo.
- Testigo positivo de *Rotavirus*: se utilizaron secciones de intestino de ratón infectadas con *Rotavirus* bovino. Esta muestra fue donada por el DVM, DSc, DACVP. Francisco Uzal y Francisco R. Carvallo del Chaigneau, College Veterinary Medicine, Virginia-Maryland.
- Testigo negativo de *Rotavirus*: se utilizaron secciones de intestino normal de un cordero, cuya causa de muerte fue por una insuficiencia cardiaca debida a un defecto congénito (persistencia del foramen oval).

Las laminillas con los órganos fueron desparafinadas en una estufa² a 60°C durante 20 min, después se colocaron en un vaso de Koplín con xilol durante 5 min a temperatura ambiente (TA) con una repetición. Para la rehidratación de los tejidos, las laminillas se sumergieron progresivamente en concentraciones decrecientes de alcohol etílico 100% (2), 95%, y 70 %, realizando lavados en cada concentración de 5 min cada uno. Posteriormente, se realizó un lavado con agua destilada durante 2 min.

Para la recuperación antigénica, se realizó un lavado con citrato buffer³ y se colocó en un microondas⁴ durante 5 min, con una potencia de 80 wt, posteriormente, atemperando a TA durante 20 min dentro del mismo equipo.

La inhibición de la peroxidasa endógena en los tejidos fue hecha con un lavado con agua destilada a TA durante 5 min y después se trataron con peróxido de hidrógeno⁵ y metanol⁶ absoluto con relación 3:7 a 4°C durante 10 min.

Para el bloqueo de proteínas se lavaron las laminillas con solución tween 20⁷, durante 5 min y se montaron en el Rack converslides⁸, colocando en cada muestra

¹ ThermoScientific, Superfrost Plus, Ref 6776214, 4481 Campus Drive Kalamazo, MI49008.

² Labnet international, Catálogo I5110A, Edison, N.J. 08837, EE.UU.

³ Spring bioscience, Catálogo PMB1-125, Koll center Pkwy, C.A. 6920, EE.UU.

⁴ 900w

⁵ J. T. Baker Peróxido de hidrógeno, Catálogo 2186-01, Xalostoc, Edo. Mex., 55320, MX.

⁶ Metanol

⁷ Tween 20: (trizma base y trizma hydrochloride; Sigma life science, Catálogo T3253-100G, cloruro de sodio; High purity)

100 µl de bloqueador de proteínas⁹ y dejándolo actuar durante 10 min. Para finalizar, se realizó un lavado con solución tween 20 a TA durante 5 min.

Se utilizó un anticuerpo monoclonal comercial de ratón en contra de los antígenos de la proteína de cápside VP6 (Capsid 2B4): sc-101363. Santa Cruz Biotechnology® como anticuerpo primario, con una dilución 1:200; 100 µl por cada laminilla, durante 30 minutos a TA. Para el anticuerpo secundario se empleó un anticuerpo conjugado con biotina comercial de cabra¹⁰, aplicando 100 µl por cada laminilla, durante 10 min a TA. Para finalizar se realizaron 4 lavados con solución tween 20, durante 2 min.

La amplificación de la inmunoreacción se utilizó estreptavidina peroxidasa¹¹, la cual se colocó 100 µl por cada laminilla y se dejó actuar durante 10 minutos a TA. Posteriormente se realizaron 4 lavados con solución tween 20 durante 2 minutos.

El revelado se realizó desmontando las laminillas del rack, colocándolas en posición horizontal en una cubeta de plástico comercial y aplicando 100 µl de diaminobencidina¹² (50 gotas de diluyente + 1 gota del cromógeno) por cada laminilla. Bajo la observación del tejido en el microscópico óptico, se estableció el tiempo de reacción de 2 min para *Rotavirus*, y se detuvo la reacción con agua destilada sin dejar secar el tejido. Se realizaron 3 lavados con agua destilada, cada uno de 3 min. El contraste se llevó a cabo mediante inmersiones en hematoxilina, de 3 a 5 min, enjuagando el exceso con agua corriente por un minuto. Se deshidrataron y aclararon sumergiéndose progresivamente en concentraciones crecientes de alcohol etílico 70 %, 95%, 100% y xilol durante de 5 min cada uno. Para el montaje se empleó resina sintética, para posteriormente ser observado al microscopio.

Estandarización de la prueba de inmunohistoquímica para Coronavirus, por la técnica de peroxidasa por micropolímeros

- En cada procedimiento se utilizó un testigo negativo y uno positivo.
- Testigo positivo de *Coronavirus*: se utilizaron secciones de intestino de ratón infectadas por *Coronavirus* bovino (BCoV). Esta muestra fue donada por el DVM, DSc, DACVP. Francisco Uzal y Francisco R. Carvalho Chaigneau, College of Veterinary Medicine, Virginia-Maryland.

⁸ Thermo scientific, Catálogo 72110017, Nápoles, CdMx. 03810, MX.

⁹ Spring bioscience, Catálogo DPB-125, Hacienda Drive Pleasanton, C.A. 94588, EE.UU.

¹⁰ Spring bioscience, Catálogo DGP-125, Hacienda Drive Pleasanton, C.A. 94588, EE.UU.

¹¹ Spring bioscience, Catálogo DSP-125, Hacienda Drive Pleasanton, C.A. 94588, EE.UU.

¹² Spring bioscience, Catálogo DAB-125, Hacienda Drive Pleasanton, C.A. 94588, EE.UU.

- Testigo negativo de *Coronavirus*: se utilizó la sección de tejido del control positivo antes mencionado, sin agregar el anticuerpo primario (positivo – negativo).

Las laminillas con los órganos fueron desparafinadas en una estufa¹³ a 60°C, durante 30 min. Se terminó de desparafinar haciendo diez inmersiones en xilol a TA. Para la rehidratación de los tejidos, las laminillas se sumergieron progresivamente en concentraciones decrecientes de alcohol etílico 100%, 96%, 80%, 70% con 10 inmersiones en cada uno. Posteriormente se realizó un lavado con agua destilada durante 2 min a TA.

Para la recuperación de antígeno, las laminillas se colocaron en un vaso de Koplin con solución recuperadora¹⁴ (solución; diluida 1:10 en agua destilada) y fueron introducidas en una olla a presión¹⁵ hasta alcanzar los 110 °C durante 10 min. Después del tiempo establecido se liberó la presión poco a poco para sacar el vaso y atemperarlo durante 20 minutos. Después se realizó un lavado durante 5 min en solución PBS.

Para la inhibición de la peroxidasa endógena fue realizada mediante inmersiones en solución de peróxido de hidrogeno y agua destilada con relación 1:5, durante 30 min a TA, con un posterior lavado de 5 min en solución PBS.

En el bloqueo de proteínas se utilizó Background Sniper¹⁶; aplicando 50 µl por cada laminilla y se incubó en una cámara húmeda en forma horizontal durante 15 min a TA. Después se interrumpió el bloqueo con un lavado de 5 min en solución PBS.

Se utilizó un anticuerpo monoclonal comercial de ratón contra el antígeno de superficie de *Coronavirus* bovino (5A4; GeneTex) como anticuerpo primario, con una dilución 1:500 µl; 50 µl por cada laminilla, y se incubaron en cámara húmeda durante toda la noche a 4 °C, con una media de 20 h. Se interrumpió la reacción con un lavado de 5 min en solución PBS. Para el anticuerpo secundario se aplicó 50 µl, por cada laminilla Mouse HRP-Polymer (MACH 2)¹⁷ y se incubó en la cámara húmeda durante 30 min a TA. Se interrumpió la reacción con un lavado durante 5 min en solución PBS. Finalmente, la incubación con el polímero se llevó a cabo a temperatura ambiente en la cámara húmeda, aplicando 50 de HRP-Polymer¹⁸.

¹³ Ecoshel, modelo 9162.

¹⁴ Solución PBS, a pH 6.0.

¹⁵ Thermofisher. DUO507.

¹⁶ Biocare medical. Catalogo BS966G, C.A. 94553, USA.

¹⁷ Biocare medical. Catalogo M1U539, C.A. 94553, USA.

¹⁸ Biocare medical. Catalogo MRH538G, C.A. 94553, USA.

El revelado se realizó, colocándolas en posición horizontal aplicando 100 µl de diaminobencidina¹⁹ (1 ml de diluyente + 1 gota del cromógeno) por cada laminilla. Bajo la observación del tejido en el microscópico óptico, se estableció el tiempo de reacción de 2:30, y se detuvo la reacción con agua destilada sin dejar secar el tejido. Se realizaron 3 lavados con agua destilada cada uno de 3 min.

El contraste se llevó a cabo mediante diez inmersiones en hematoxilina, enjuagando el exceso con agua corriente por un min, seguido de diez inmersiones en agua amoniacal y finalmente diez inmersiones en agua destilada.

Se deshidrataron y aclararon sumergiéndose progresivamente en concentraciones crecientes de alcohol etílico 70%, 95%, 100% y xilol, en diez inmersiones cada uno. Para el montaje se empleó resina sintética, para posteriormente ser observado al microscopio.

Determinación porcentual de inmunopositividad

Se determinó el porcentaje de los animales que fueron inmunopositivos para *Coronavirus* y/o *Rotavirus*. Se estableció en porcentaje para *Rotavirus* y *Coronavirus* por especie y edad. Además, se determinó el porcentaje de los animales que presentaban inmunopositividad para ambos patógenos, así también con participaciones bacterianas; identificadas por cultivo y evidencia en el corte histológico, parásitos identificados mediante estudio coproparasitoscópico y en el corte histológico.

Correlación de Pearson entre edad de los animales y gravedad de lesiones microscópicas

Tomando como variables: cabra, borrego, enteritis, edad (0 – 120 días). Se analizó la correlación de la edad de los animales (0 – 120 días) de cabritos y corderos inmunopositivos a *Coronavirus* y *Rotavirus* con la gravedad de cada una de las 7 lesiones microscópicas evaluadas, utilizando p de Pearson con ayuda de Statistical Analysis Software SAS.

¹⁹ Biocare medical. Catalogo BDB900B, C.A. 94553, USA.

RESULTADOS

Estudio retrospectivo

En un periodo del 2009 al 2019 de todos los casos remitidos a la USEDICO, 402 fueron casos de necropsias de corderos y cabritos de los cuales 166 fueron por síndrome diarreico (Cuadro 4).

Cuadro 4. Casos remitidos a la USEDICO por presentar SDN.

	Total	Cabritos	Corderos
Remitidos por *SD		105	61
Edad de 0 a 60 días	166	68	39
Edad de 60 a 120 días		37	22
Con avanzados cambios autolíticos	84	53	31
Lesiones microscópicas sugerentes	82	52	30
Edad de 0 a 60 días		29	15
Edad de 60 a 120 días		23	15

Lesiones macroscópicas

Las lesiones y hallazgos más frecuentes en la inspección externa: contenido amarillo semilíquido amarillo (Figura 3a) y en la inspección interna se observó congestión, dilatación de asas intestinales, adelgazamiento con contenido amarillo semilíquido amarillo. (Figura 3b), (Cuadro 5).

Cuadro 5. Hallazgos y lesiones macroscópicas en tracto gastrointestinal encontradas en casos de cabritos y corderos remitidos por SDN.

	Cabritos 0 – 60	Cabritos 60 – 120	Corderos 0 – 60	Corderos 60 – 120
Material fecal perianal	23	12	3	10
Dilatación de asas intestinales	50	37	39	22
Adelgazamiento de paredes intestinales	50	37	38	22
Contenido amarillo semilíquido	56	23	18	18
Congestión de asas intestinales	32	12	10	14
Hiperplasia linfoide	4	8	0	3
Sin lesiones macroscópicas referidas	16	5	2	3
Autolíticos	11	3	1	2

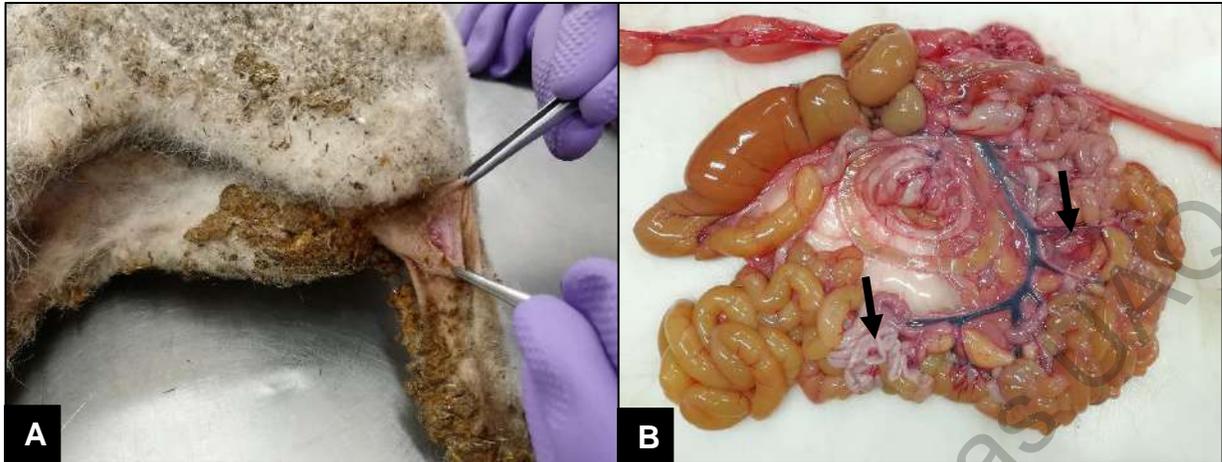


Figura 3. Lesiones y hallazgos macroscópicos A. Cabrito, con abundante material fecal seco adherido a la región perianal. B. Intestinos delgado y grueso de cabrito, los cuales las asas estaban dilatadas, brillantes, adelgazadas y con material amarillo en su interior, además de escasas áreas rojas compatibles con congestión (flechas).

Evaluación de lesiones histológicas

En casos inmunopositivos a *Coronavirus* y *Rotavirus* se observaron que las lesiones más frecuentes en forma grave fueron: enteritis linfoplasmocítica, fusión y acortamiento de vellosidades (Figura 4).

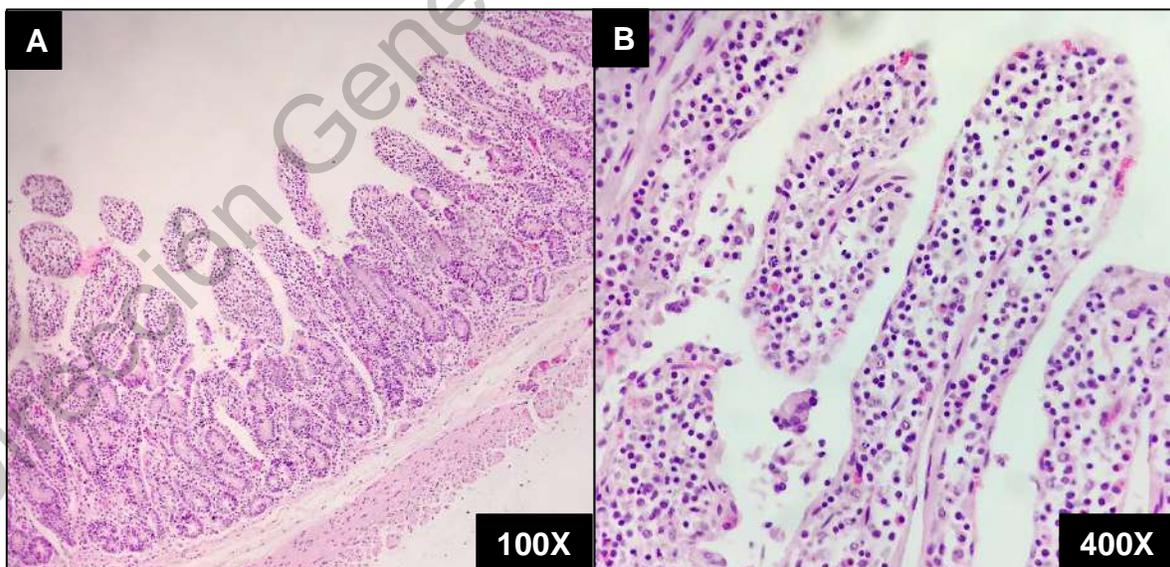


Figura 4. Lesiones microscópicas en intestinos HE. A. SDC.10.297; cordero con 95 días de edad con abundante infiltrado inflamatorio que está distribuido en la lámina propia. B. infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos y células plasmáticas.

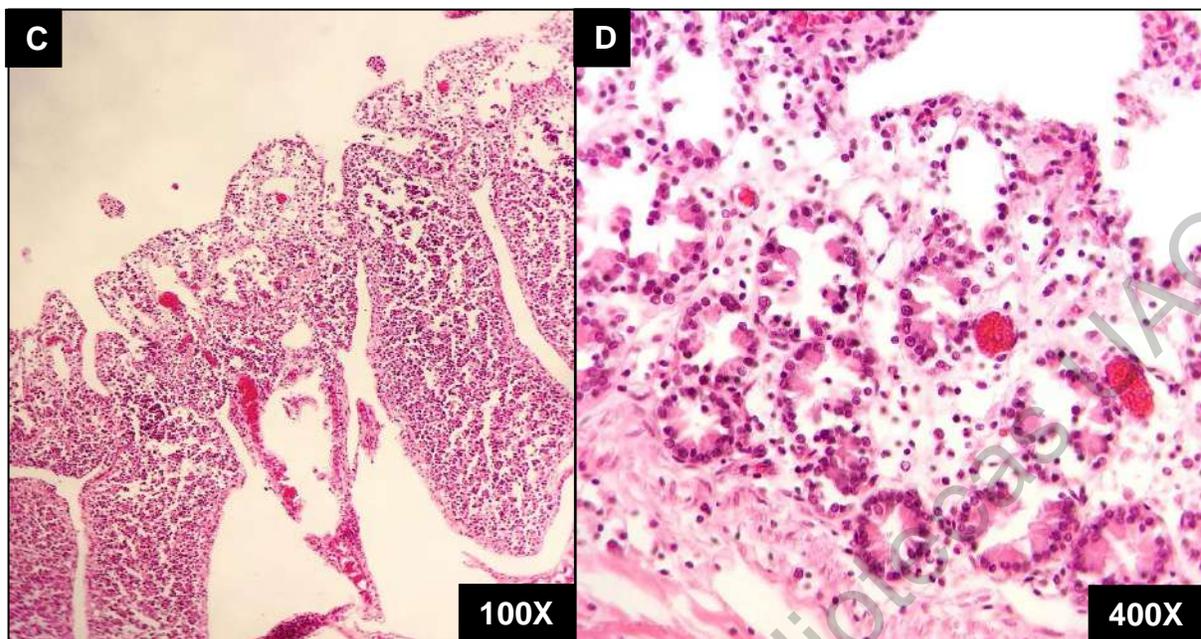


Figura 4. Lesiones microscópicas en intestinos HE. C. SDC.11.093; cabrito con 14 días de edad con fusión grave de las vellosidades y acortamiento moderado de vellosidades. **D.** SCD.18.207: cabrito con 2 días de edad, se observa acortamiento grave de las vellosidades con moderado infiltrado inflamatorio linfoplasmocítico.

Cabritos

La frecuencia en los casos de cabritos inmunopositivos a *Coronavirus* en forma grave de enteritis linfoplasmocítica, fusión y acortamiento de vellosidades osciló entre un 57 a 75%, del total de los casos de 0 a 120 días. Sin embargo, en casos inmunopositivos a *Rotavirus* la fusión de vellosidades en forma grave la frecuencia fue del 81.8% de los casos con edades entre 0 a 60 días (Cuadro 6).

Corderos

Los corderos fue la especie donde se observó alta frecuencia en lesiones moderadas y graves, siendo los casos inmunopositivos a *Coronavirus* más representativos. En casos inmunopositivos a *Rotavirus* enteritis linfoplasmocítica, atrofia y fusión de vellosidades en forma grave osciló entre un 66.6 a 100% (Cuadro 6).

Cuadro 6. Gradificación de lesiones intestinales en corderos y cabritos inmunopositivos a *Coronavirus* y *Rotavirus*. USEDICO. FMVZ-UNAM. 2009-2019.

	<i>Coronavirus</i>				<i>Rotavirus</i>			
	Cabritos 0 – 60	Cabritos 60 – 120	*Corderos 0 – 60	*Corderos 60 – 120	Cabritos 0 – 60	Cabritos 60 – 120	Corderos 0 – 60	Corderos 60 – 120
EL	42.8% G	50% G	80% G	71.4% G	54% G	62.5% M	50% M	100% G
FV	75% G	50% G	80% G	71.4% G	81.8% G	50% M	75% G	66.6% G
AV	57.1% G	37% M-G	100% G	42.8% M-G	72.8% G	50% M	100% G	50% M-G
AE	42.8% L	50% L	60% G	100% L	54.5% L	50% L-M	75% M	100% L
NC	57.1% L	100% L	40% L-M	42.8% M-G	45.4% L	75.7% L	50% L	33.3% L-G
NV	71.4% L	62.5% M	80% M	71.4% M	45.4% L	62.5% M	50% M	66.6% M
DE	57% M	100% M	60% L	45.4% L-M	45.4% L-M	50% M	50% M	66.6% L

Abreviaturas: **EL**: Enteritis linfoplasmocítica; **FV**: Fusión de vellosidades; **AV**: Acortamiento de vellosidades; **AE**: Atenuación epitelial; **NC**: Necrosis de criptas; **NV**: Necrosis de vellosidades; **DE**: Desprendimiento epitelial; **L**: ligera; **M**: moderada; **G**: grave.

*Obsérvese que los corderos fue la especie donde hay una alta frecuencia en lesiones moderadas y graves, siendo los casos inmunopositivos a *Coronavirus* más representativos.

Imunohistoquímica.

Coronavirus.

La frecuencia de inmunopositividad se observó principalmente en los enterocitos de las vellosidades, en enterocitos desprendidos, material necrótico, células caliciformes, células de criptas, histiocitos y neutrófilos (Figura 5).

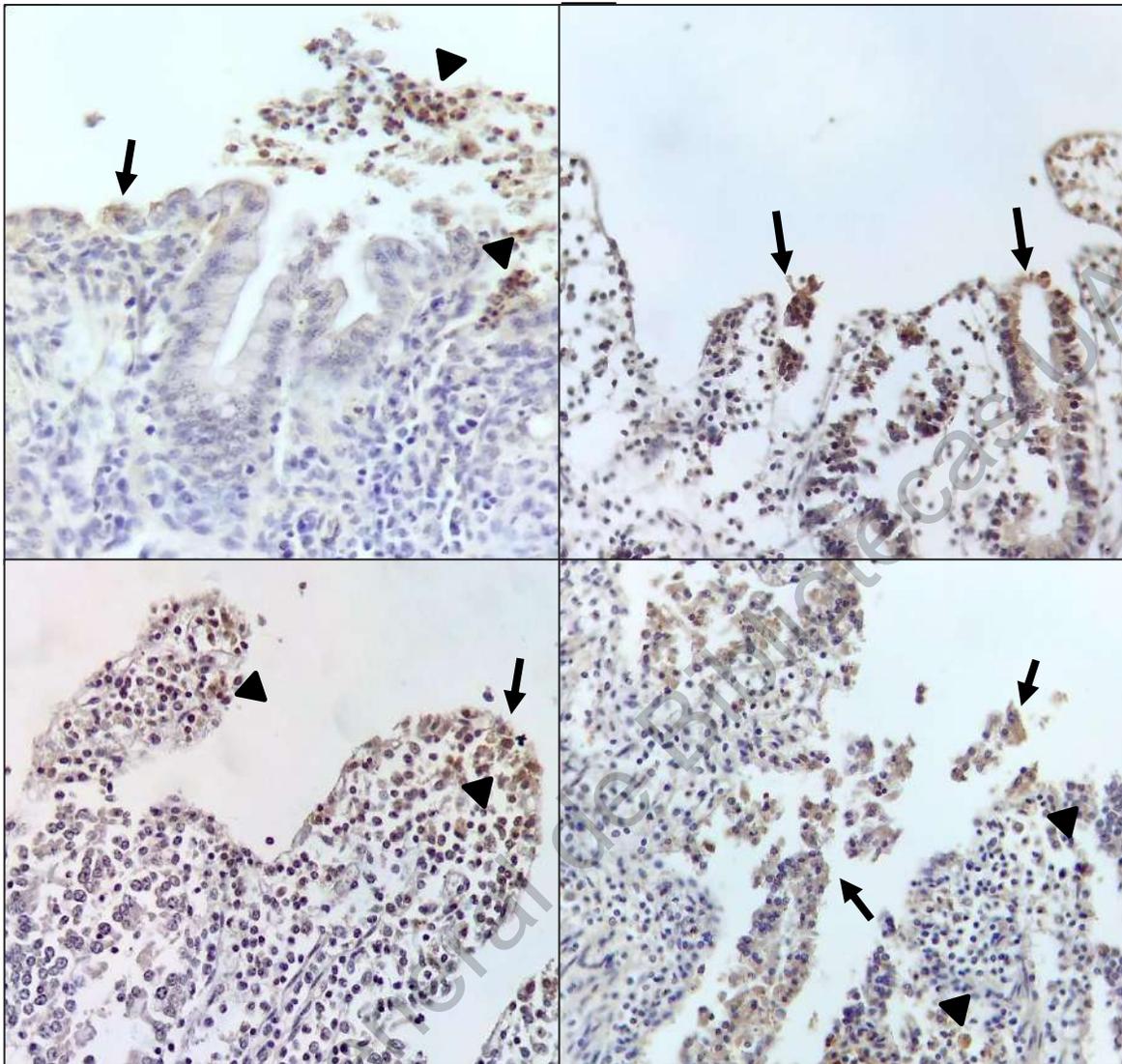


Figura 5. Inmunopositividad a *Coronavirus*. **A.** Sección de intestino de ratón con inmunopositividad en enterocitos (**flechas**) y células inflamatorias (**punta de flecha**) (control positivo). **B.** Secciones de intestino de corderos de 90 días con inmunopositividad en enterocitos. **C.** Inmunopositividad en enterocitos y células inflamatorias en secciones de intestino de un cordero de 28 días. **D.** Inmunopositividad en enterocitos en secciones de intestino de un cabrito de 5 días.

De los 404 casos de cabritos remitidos a la USEDICO; 166 fueron casos que presentaron diarrea; 15 casos de cabritos fueron inmunopositivos y 12 casos de corderos (Cuadro 7).

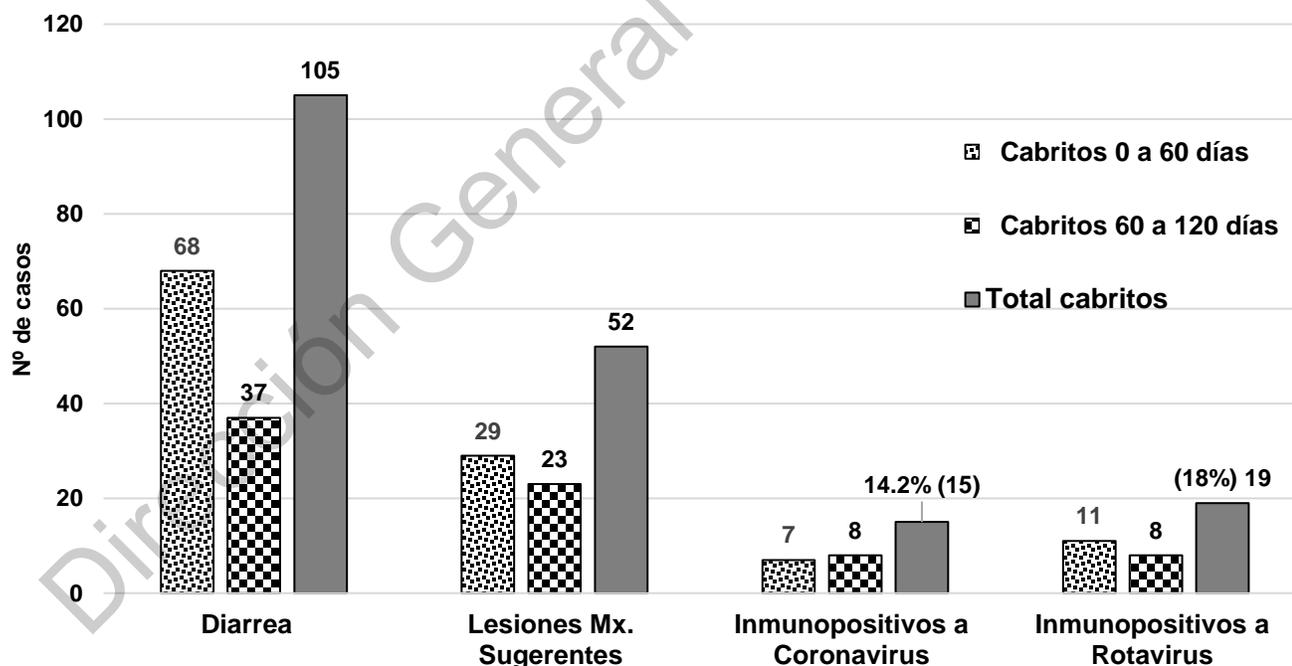
Cuadro 7. Inmunopositividad a *Coronavirus* en corderos y cabritos que cursaron con SDN, remitidos a la USEDICO. FMVZ-UNAM. 2009-2019.

	Cabritos 0 – 60	Cabritos 60 – 120	Total	Corderos 0 – 60	Corderos 60 – 120	Total
Remitidos por diarrea	68	37	105	39	22	61
*Procesados a IHQ	29	23	52	15	15	30
Inmunopositivos	7	8	15	5	7	12

*Los casos presentaron lesiones sugerentes a infecciones por *Coronavirus*.

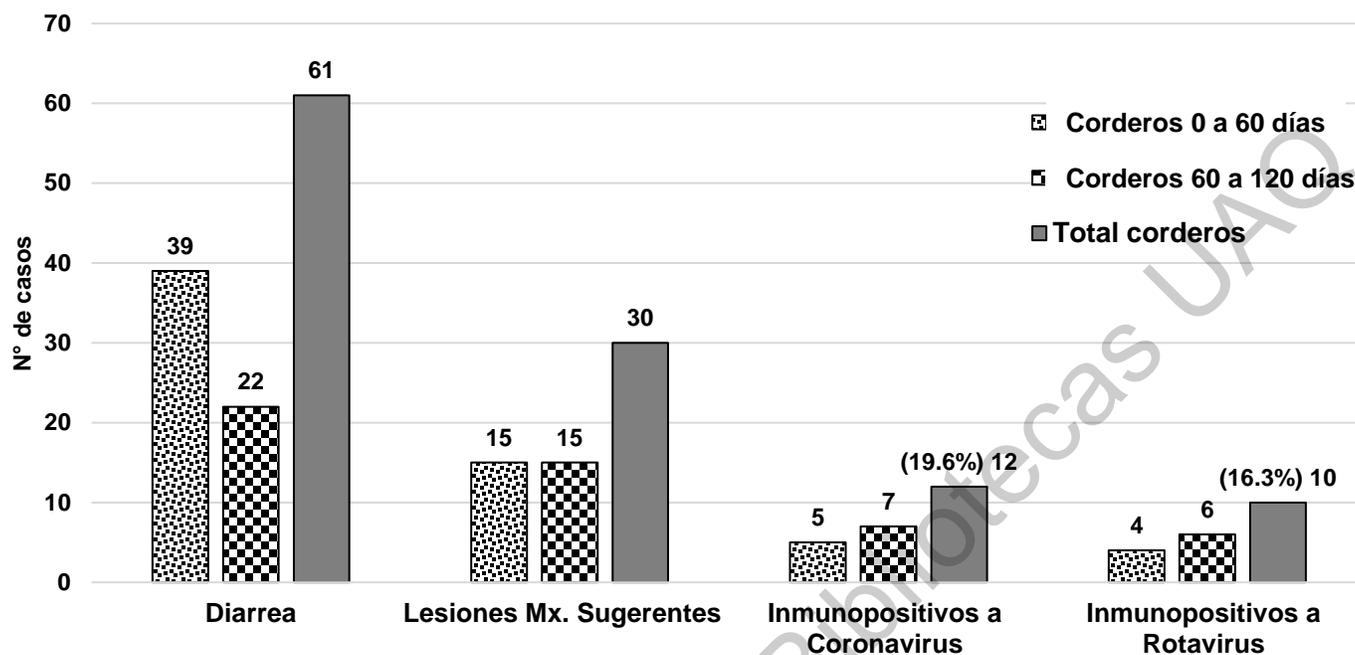
En cabritos la frecuencia de inmunopositividad en casos de diarrea fue de 15 casos (14.2%); 7 cabritos (6.6%) con edades de 0 a 60 días, 8 (7.6%) con edades entre 60 a 120 días (Figura 6). Y la frecuencia de inmunopositividad en corderos con diarrea fue de 12 casos (19.6%); 5 cabritos (8.1%) con edades de 0 a 60 días, 7 (11.4%) comprendían edades entre 60 a 120 días (Figura 7).

Figura 6. Frecuencia de inmunopositividad en cabritos con diarrea.



De los 105 cabritos remitidos por diarrea, 52 casos fueron procesados para inmunohistoquímica debido a que presentaron lesiones microscópicas sugerentes a infección por *Coronavirus* y *Rotavirus*. Se observó una frecuencia de casos del 14.2% inmunopositivos a *Coronavirus* y 18% inmunopositivos a *Rotavirus*, de los casos remitidos por diarrea.

Figura 7. Frecuencia de inmunopositividad en corderos con diarrea.



De los 61 corderos remitidos por diarrea, 30 casos presentaban lesiones microscópicas sugerentes y fue el número de casos a procesar para inmunohistoquímica. Se observó una frecuencia de casos del 19.6% inmunopositivos a *Coronavirus* y 16.3% inmunopositivos a *Rotavirus*, de los casos remitidos por diarrea.

Rotavirus.

La frecuencia de inmunopositividad se observó principalmente en algunos enterocitos de vellosidades, de las criptas y desprendidos; incluyendo células caliciformes, material necrótico e histiocitos. Sin embargo, la inmunopositividad en algunas partes es muy tenue (Figura 8).

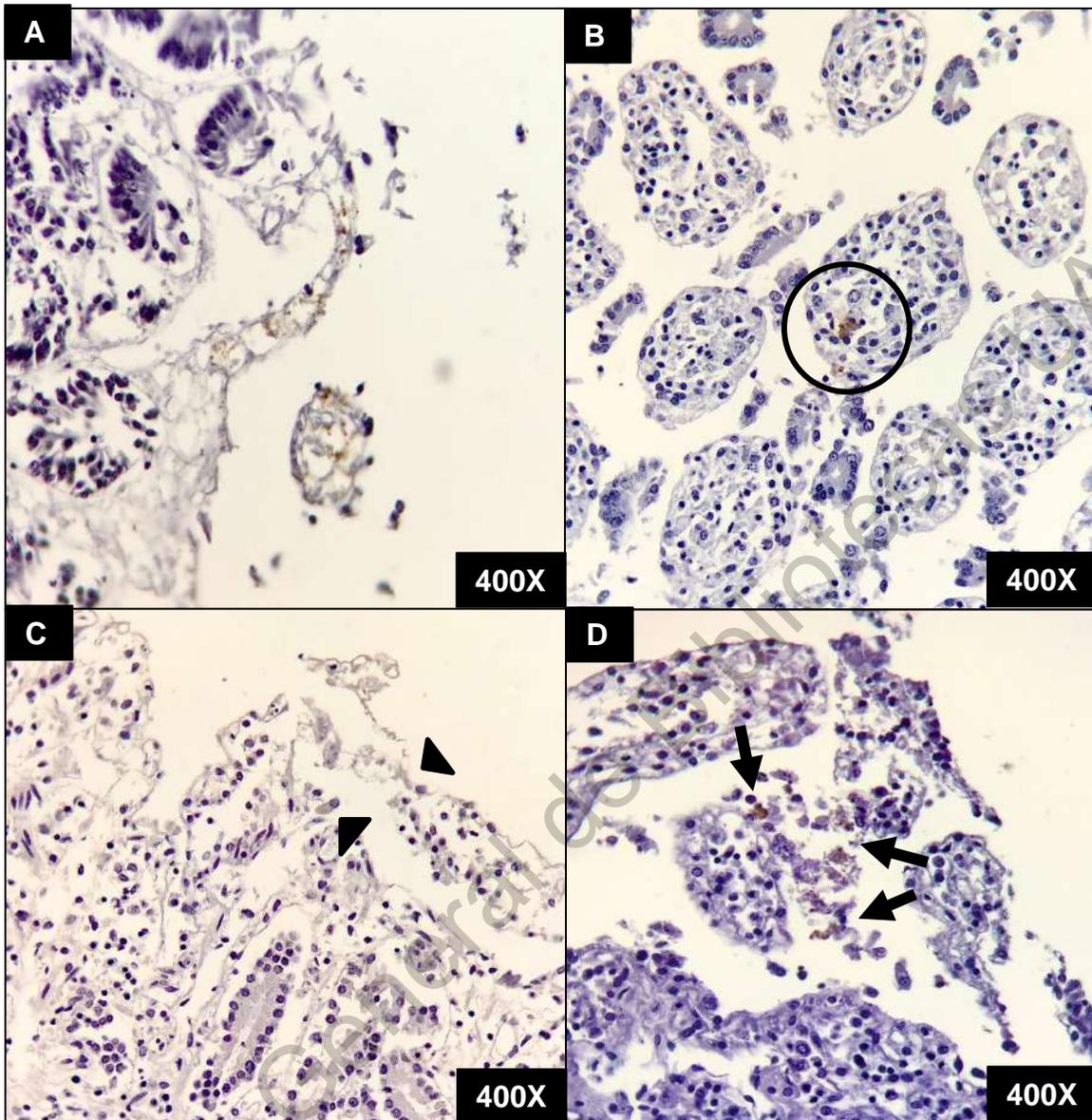


Figura 8. Inmunopositividad a *Rotavirus*. **A.** Sección de intestino de ratón con inmunopositividad en enterocitos y células inflamatorias (control positivo). **B.** Secciones de intestino de cabrito de 30 días con inmunopositividad en enterocitos de vellosidad (circulo). **C.** Inmunopositividad en enterocitos y células inflamatorias en secciones de intestino de un cabrito de 30 días (punta de flecha). **D.** Inmunopositividad en enterocitos y células inflamatorias en secciones de intestino de un cabrito de 90 días (flechas).

Cuadro 9. Correlación de lesiones intestinales inmunopositivos a *Coronavirus* y *Rotavirus* con la edad (0 a 120 días) en cabritos. USEDICO. FMVZ-UNAM. 2009-2019.

De los 404 casos de cabritos remitidos a la USEDICO; 166 fueron casos que presentaron diarrea; 19 casos de cabritos fueron inmunopositivos y 10 casos de

Cuadro 8. Inmunopositividad a *Rotavirus* en corderos y cabritos que cursaron con SDN, remitidos a la USEDICO. FMVZ-UNAM. 2009-2019.

	Cabritos 0 – 60	Cabritos 60 – 120	Total	Corderos 0 – 60	Corderos 60 – 120	Total
Remitidos por diarrea	68	37	105	39	22	61
*Procesados a IHQ	29	23	52	15	15	30
Inmunopositivos	11	8	19	4	6	10

*Los casos presentaron lesiones sugerentes a infecciones por *Coronavirus*. corderos (Cuadro 8).

En cabritos la frecuencia de inmunopositividad en casos de diarrea fue de 19; 11 cabritos con edades de 0 a 60 días, 8 comprendían edades entre 60 a 120 días (Figura 6). Y la frecuencia de inmunopositividad en corderos con diarrea fue de 10 casos; 4 de corderos comprendían edades entre 0 a 60 días y 6 con edades entre 60 a 120 días (Figura 7).

Correlación de *P* de Pearson entre la edad y la gravedad de las lesiones

Mediante Statistical Analysis Software (SAS) no se observó ninguna correlación de la gravedad de las diferentes lesiones analizadas (enteritis linfoplasmocítica, acortamiento y fusión de vellosidades, atenuación epitelial, necrosis de criptas y de vellosidades y desprendimiento epitelial) con la edad de los animales, que fueron inmunopositivos a *Coronavirus* y *Rotavirus* (Cuadros 9 y 10).

	<i>Coronavirus</i>		<i>Rotavirus</i>	
	Coeficiente de correlación de Pearson	*Pr>F	Coeficiente de correlación de Pearson	*Pr>F
EL	22.50	0.4200	1.8	0.4200
FV	-35.32	0.1965	-42.47	0.1965
AV	-41.64	0.1212	-50.90	0.1212
AE	7.04	0.8030	-2.82	0.8030
NC	-56.33	0.0238	-29.22	0.0238
NV	24.09	0.3870	-2.91	0.3870
DE	-60.83	0.016	-22.2	0.016

Abreviaturas: **EL**: Enteritis linfoplasmocítica; **FV**: Fusión de vellosidades; **AV**: Acortamiento de vellosidades; **AE**: Atenuación epitelial; **NC**: Necrosis de criptas; **NV**: Necrosis de vellosidades; **DE**: Desprendimiento epitelial. *(Pr>0-.05).

Frecuencia de infecciones mixtas en casos de diarrea

Infecciones mixtas

Cuadro 10. Correlación de lesiones intestinales inmunopositivos a *Coronavirus* y *Rotavirus* con la edad (0 a 120 días) en corderos. USEDICO. FMVZ-UNAM. 2009-2019.

	<i>Coronavirus</i>		<i>Rotavirus</i>	
	Coeficiente de correlación de Pearson	*Pr>F	Coeficiente de correlación de Pearson	*Pr>F
EL	5.44	0.5673	**60.6	0.0638
FV	-33.90	0.2803	-30.44	0.3923
AV	-33.60	0.2856	-43.44	0.2096
AE	-67.03	0.0171	-50.60	0.1356
NC	21.53	0.4941	23.50	0.9486
NV	28.53	0.3686	16.90	0.6404
DE	**62.11	0.0311	-37.48	0.2858

Abreviaturas: **EL**: Enteritis linfoplasmocítica; **FV**: Fusión de vellosidades; **AV**: Acortamiento de vellosidades; **AE**: Atenuación epitelial; **NC**: Necrosis de criptas; **NV**: Necrosis de vellosidades; **DE**: Desprendimiento epitelial. *(Pr>0-.05).

**Enteritis linfoplasmocítica y desprendimiento epitelial, tienen coeficientes mayores, sin embargo, no tienen correlación con la edad de los animales ya que su valor de p no es mayor a 0.05. además, por factores en la histotecnología el desprendimiento epitelial puede variar.

Los casos que presentaron participación de *Escherichia coli*, fueron casos con aislamiento e identificación bacteriológico en cantidad abundante y evidencia de bacterias intralesionales en las secciones de intestino. Los casos que reportaron coccidias fueron casos que reportaron conteos mediante Mc master de 200 a 66,850 ooquistes por gramo de heces y eran evidenciados los microgametos en las secciones de intestino. El conteo de estrogiloides fue de 100 a 200 huevos por gramo de heces. Finalmente, el único caso donde se encontró la presencia de *Cryptosporidium* spp mediante histoquímica (Ziehl Nielsen) se observaron estructuras intracitoplasmáticas ácido-alcohol-resistentes.

Los corderos fue de las especies que presentó la participación de más agentes en cuadros diarreicos, excepto la presencia de *Cryptosporidium* spp. La participación de *Coronavirus* y *Rotavirus* en ambas especies se observó igual. Sin embargo, la presentación de *Rotavirus* y *Escherichia coli* en cabritos fue mayor por un caso que en corderos (Cuadro 11).

Cuadro 11. Infecciones mixtas en cabritos y corderos inmunopositivos a *Coronavirus* y *Rotavirus*.

	Cabritos 0 – 60	Cabritos 60 – 120	Total	Corderos 0 – 60	Corderos 60 – 120	Total
<i>Coronavirus</i>	7	8	15	5	7	12
<i>Coronavirus</i> + <i>Rotavirus</i>	4	3	7	2	5	7
<i>Coronavirus</i> + <i>E. coli</i>	0	0	0	0	1	1
<i>Coronavirus</i> + coccidias	0	3	3	1	1	2
<i>Coronavirus</i> + <i>Rotavirus</i> + coccidias + estrongilidos	0	0	0	1	1	2
<i>Rotavirus</i>	11	8	19	4	6	10
<i>Rotavirus</i> + <i>E. coli</i>	3	1	4	2	1	3
<i>Rotavirus</i> + coccidias	0	0	0	1	2	3
<i>Rotavirus</i> + <i>Cryptosporidium</i> spp.	1	0	1	0	0	0

Otros hallazgos

Además de las lesiones a nivel intestinal y la diarrea reportada, hubo casos de corderos y cabritos que fueron inmunopositivos a *Rotavirus* y *Coronavirus* y cursaron con cuadros neumónicos de agudos a subagudos; observándose más frecuencia en estos últimos (Cuadro 12).

Cuadro 12. Casos de cabritos y corderos inmunopositivos a *Coronavirus* y *Rotavirus* con cuadros neumónicos.

Casos con cuadros neumónicos e inmunopositivos	Cabritos 0 – 60	Cabritos 60 – 120	Total	Corderos 0 – 60	Corderos 60 – 120	Total
<i>Coronavirus</i>	0	4	4	1	0	1
<i>Rotavirus</i>	2	2	4	1	0	1
<i>Coronavirus</i> + <i>Rotavirus</i>	2	3	5	2	1	3

DISCUSIÓN

La diarrea en corderos y cabritos puede definirse como un complejo multifactorial. Las interacciones entre la susceptibilidad animal, estado nutricional, factores ambientales, manejo de rebaños y una variedad de agentes infecciosos actúan a menudo en un modo sinérgico que pueden influir en la aparición y evolución de la enfermedad (Martella *et al.*, 2015). Las patologías infecciosas pueden ser causadas por bacterias, virus, parásitos; a menudo en sinergia y generalmente caracterizada por una alta morbilidad y mortalidad. Agentes como *Rotavirus*, *Coronavirus* y bacterias, como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Clostridium* spp (Singh *et al.*, 2018), *Cryptosporidium parvum* y *Giardia intestinalis* se han reportado en casos de diarrea en cabritos y corderos (Ozmen, *et al.*, 2006).

Las lesiones macroscópicas encontradas en los animales del presente estudio, tales como dilatación de asas intestinales, con moderado contenido amarillo claro coinciden con lo reportado por Uzal *et al.* (2016) y Ozmen *et al.* (2018). Además de congestión de asas intestinales en forma difusa que fueron observadas en infecciones por *Rotavirus* por Snodgrass *et al.* (1977) y Singh *et al.* (2020); éste último fue reportado en terneros con infecciones por *Coronavirus* y *Rotavirus*. Por tanto, macroscópicamente con estas lesiones, se puede tener diagnóstico

diferencial de *Rotavirus* y *Coronavirus*, aunque Park *et al.*, (2007) menciona que son indistinguibles.

Microscópicamente las lesiones encontradas en el presente estudio coinciden con las reportadas por Chen *et al.* (2018), en infecciones de *Rotavirus* tipo B en cabras, Snodgrass *et al.* (1977), Gelberg (2017) y Ozmen *et al.* (2006; 2018), en infecciones por *Coronavirus* en corderos y cabritos con diarrea y con diagnóstico por inmunohistoquímica. Así mismo, las lesiones encontradas en infecciones por *Rotavirus* y *Coronavirus* en terneros mediante inmunohistoquímica, establecidas por Pak *et al.* (2007) y Singh *et al.*, (2020) coincidían con las reportadas en el presente estudio.

En el presente trabajo los esquemas establecidos para evaluar lesiones histológicas en modelos murinos por Erben *et al.* (2014) destacan de ser fáciles y rápidos de aplicar en otras especies a pesar de no usar *Rotavirus* y *Coronavirus* como agente infeccioso. Sin embargo, un experimento llevado a cabo por Kashyap *et al.* (2018) en el cual se inocularon ratones con *Rotavirus* tipo A, menciona que la degeneración vacuolar en los enterocitos es una lesión característica en murinos por este agente y por tanto disminuye la comparación entre especies, pero la evaluación del infiltrado mononuclear es confiable.

La frecuencia de *Rotavirus* en cabritos (18%) en el presente trabajo es ligeramente más alta en comparación con los corderos (16.3%). *Rotavirus* es el agente viral más estudiado en síndrome diarreico neonatal, siendo el patógeno más frecuente encontrado en cabritos (Snodgrass *et al.*, 1982, Ozmen *et al.*, 2006, 2018, Schoenian *et al.*, 2007, Singh *et al.*, 2017, 2018). No es posible comparar los porcentajes reportados en trabajos anteriormente mencionados ya que son estudios de prevalencia, e incidencia; tienen diferente número de individuos, enfermos y las condiciones de experimentación estuvieron estrictamente estandarizadas, sin embargo, al ser el primer trabajo en México, es importante para fundamentar que *Rotavirus* está presente en cabritos y corderos que cursan con síndrome diarreico neonatal.

Ozmen *et al.* (2018), finalmente a partir de su estudio mencionan que *Coronavirus* no es un agente etiológico importante en la enteritis neonatal de pequeños animales, pero puede ser un agente etiológico del futuro. El presente trabajo a pesar de ser un estudio retrospectivo no queda fuera de esta aclaración ya que la frecuencia observada en el presente trabajo no está muy alejada de la reportada para *Rotavirus*.

En el presente estudio se observó frecuencia hasta los 4 meses de edad y contrasta con Ozlem *et al.* (2018), que mencionan que la edad de presentación en

ambas especies es de 0 a 21 días, y de hasta 12 días como límite. Así como muchos estudios (Holland *et al.*, 1990, Theil *et al.*, 1995, Salihi *et al.*, 2018) que utilizan y refieren que las infecciones por *Rotavirus* y *Coronavirus* diagnosticadas por inmunocromatografía, RT-PCR y secuenciación, son hasta el primer mes. Fue en Inglaterra en 1978, donde se encontró, por primera vez *Rotavirus*, asociados a un brote de diarrea que afectó de 4 a 6 cabritos, de cuatro meses y fue diagnosticado por microscopía electrónica. También el rango de edad en el presente estudio es fundamentado por Shabana *et al.* (2017), quienes encontraron frecuencia en animales de hasta 12 meses, así como Yilmaz *et al.* (2017), que encontró seroprevalencia de 55.3% en borregas de 2 a 3 años. Sin embargo, el valor diagnóstico por ELISA y RT-PCR es variable, ya que, mediante inmunohistoquímica, se comparan lesiones con la presencia *in situ* del agente, lo que le da un valor diagnóstico más certero. La presencia de *Coronavirus* y *Rotavirus* es más alta en pequeños rumiantes en comparación con la frecuencia en terneros. Tal como lo demuestra Singh *et al.* (2020), que mediante inmunohistoquímica y RT-PCR reportan en terneros frecuencia baja en comparación al presente trabajo, también Mohebbi *et al.* (2017), que reporta una prevalencia de *Coronavirus* de 7.2% mediante ELISA indirecta, siendo baja en comparación con lo que se observó en un estudio parecido actual, pero en corderos y cabritos por Burimuah *et al.* (2020) con prevalencias de 25.8% y 43.1% respectivamente. Sin embargo, en un estudio realizado por Wani *et al.* (2007), que mediante PAGE y ELISA indirecta reveló una prevalencia de 18.7% en terneros y 9.8% en corderos para *Rotavirus* tipo A.

Coronavirus es un importante agente etiológico en la diarrea neonatal del ternero, a pesar de que tiene poca importancia en la enteritis neonatal de corderos y cabritos tal como lo menciona Durham *et al.* (1979), Reinhard *et al.* (1995), Muñoz *et al.* (1996), Eisa y Mohamed, (2014). El conocimiento a partir del grupo viral que afecta a pequeños rumiantes se ha establecido en estudios previos como lo establecido por Snodgrass *et al.* (1980), y recientemente se han encontrado anticuerpos en cabras contra β *Coronavirus* (Gumusova *et al.*, 2007), estableciendo una prevalencia del 41.1%. En la actualidad se realizó un estudio por Burimuah *et al.* (2020), en África, en ganado silvopastoril para determinar prevalencias de β *Coronavirus*: reportando 25.8% para borregos y 43.1% en cabras. Su hallazgo en ovejas y cabras proporciona información actualizada sobre la propagación de β *Coronavirus* bovino en pequeños rumiantes.

A partir de la antigenicidad de los anticuerpos monoclonales en el presente estudio, se puede fundamentar que β *Coronavirus* está presente en corderos y cabritos con diarrea entre edades de 0 a 120 días, el cual coincide con lo que

reporta Martella *et al.* (2015) y fundamenta que el *Coronavirus* bovino es el que afecta a pequeños rumiantes como lo refieren los autores antes mencionados.

Existen más estudios que reportan la identificación de *Rotavirus* en diarrea neonatal en cabritos y corderos, en comparación con los establecidos para *Coronavirus*. Se han descrito al menos tres especies de *Rotavirus*: *Rotavirus* tipo A por Kaminjolo *et al.* (1994), Gazal *et al.* (2011), Yilmaz *et al.* (2017) y Singh *et al.* (2017; 2018). Tipo B por Muñoz *et al.* (1996) y Chen *et al.* (2018), y el tipo C por Muñoz *et al.* (1996). Sin embargo, ningún estudio a través de inmunohistoquímica ha demostrado un tipo de *Rotavirus*. El anticuerpo monoclonal contra la proteína estructural VP6 de *Rotavirus* utilizado en el presente estudio, no define que grupo de *Rotavirus* está implicado y por tanto puede indicar que pudiera estar implicado alguno de los tres tipos.

La capacidad que tiene *Coronavirus* bovino para que afecte a pequeños rumiantes es gracias a las interacciones de la proteína S espiga y el receptor de la célula huésped, cada vez es más evidente la activación proteolítica de la proteína S. Las proteasas de la célula huésped también juegan un papel crítico (Kaoru *et al.*, 2015), además de la capacidad de los virus RNA en generar equivocaciones de la polimerasa y retrotranscriptasa durante su transcripción y traducción (Avedaño, 2014). Además de la cercanía que pudiesen tener entre especies de ganado de producción (Burimuah *et al.*, 2020). En el caso de *Rotavirus*; es un patógeno zoonótico que se ha encontrado en la mayoría de las especies animales (Cook *et al.*, 2004). La variación del genotipo de las proteínas VP7 y VP4 que participan en la patogenia, además de los genotipos estudiados por sus proteínas estructurales NSP, han encontrado muchas similitudes entre especies; estudios de Hibridación reportan que las cepas caprinas derivan de eventos de reordenamiento o transmisión inter-especies (Papp *et al.*, 2014).

Actualmente, no hay ningún estudio que relacione la edad de corderos y cabritos con la gravedad de las lesiones. En el presente estudio la lesión microscópica más grave fue la enteritis linfoplasmocítica sin correlación representativa. En el estudio llevado a cabo por (Kashyap *et al.*, 2018), la inflamación mononuclear en ratones infectados por *Rotavirus* se observó en edades menores y de forma grave, así como en los estudios realizados por (Ozmen *et al.*, 2006, 2018) reportaron que la inflamación se observaba en forma grave los animales positivos. Por tanto, la correlación no observada en este trabajo es importante y establece la importancia de generar escalas de medición para cada una de las lesiones intestinales ocasionadas por *Rotavirus* y *Coronavirus*.

Finalmente, en el presente estudio se observó participación de otros agentes tales como *Escherichia coli*, *Cryptosporidium* spp, siendo *Escherichia coli* la más

frecuente, habiendo complicaciones cuando hay interacción con varios agentes (Tzipori *et al.*, 1981), generando un cambio en el microclima de intestino que repercute en la microbiota, agravando el daño (Wang *et al.*, 2018). Snodgrass *et al.*, (1982), menciona que el *Rotavirus* en una dosis subletal de ETEC se podría volver letal. La presencia de *Cryptosporidium* spp en un solo caso del presente trabajo no es representativo y contrasta con lo reportado por (Ozmen *et al.*, 2006); que *Cryptosporidium parvum* es el agente causante de diarrea más importante en cabritos y corderos. Algunas coccidias compatibles con *Eimeria* spp fueron encontradas en el presente trabajo, (Underwood *et al.*, 2015), menciona que *Eimeria* spp es un agente que complica la diarrea (Cardiel *et al.*, 2011).

En el presente trabajo los animales estudiados que resultaron inmunopositivos a *Coronavirus* y *Rotavirus* algunos cursaban con neumonía siendo más frecuente cabritos inmunopositivos a *Coronavirus*. Actualmente no hay un estudio en el cual se observe dualismo infeccioso por *Coronavirus*; respiratorio e intestinal referido en cabras y borregos, sin embargo, experimentalmente se reportó en terneros de 2 a 5 días mediante inmunohistoquímica (Park *et al.*, 2007). Cardiel *et al.* (2011), informaron dos casos de bronconeumonía en pequeños rumiantes con infección por *Rotavirus* de forma experimental. Las infecciones extraintestinales han sido reportadas en modelos murinos (Ramig, 2004, Kashyap *et al.*, 2018) y en cabras con negatividad extraintestinal (Snodgrass *et al.*, 1977). A partir de la variabilidad genética, hay una cercanía estrechamente relacionada filogenéticamente entre especies, así mismo el cambio a diferentes tropismos tisulares y en huésped. Es posible que en el caso de las cepas respiratorias y digestivas de *Coronavirus* que afectan a vacunos, se puedan encontrar causando infección respiratoria en pequeños rumiantes, así como la posibilidad de encontrar en forma extraintestinal a *Rotavirus* en infecciones entéricas en pequeños rumiantes.

Para entender mejor la etiología de las diarreas neonatales, es necesario considerar otras variables que han sido asociadas en el problema; tales como la privación de calostro en cantidad y calidad, inadecuadas medidas de manejo, estado sanitario y estrés prolongado, que comprometen el bienestar animal en forma negativa. Por otra parte, una enfermedad concurrente puede desencadenar la presentación de otras, generando pérdidas económicas acentuado por la utilización de tratamientos inadecuados en caso de diarreas neonatales sin algún diagnóstico.

CONCLUSIONES

- Estandarizando las técnicas de inmunohistoquímica, en el presente trabajo se identificó la presencia de *Coronavirus* y *Rotavirus* en casos de diarrea en corderos y cabritos con edades entre 0 a 120 días, con inmunopositividad en los enterocitos de las puntas de las vellosidades, en células de las criptas, células caliciformes, histiocitos, células inflamatorias y material necrótico.
- A partir del estudio retrospectivo de los casos de diarrea en corderos y cabritos en el altiplano mexicano remitidos a la USEDICO, las lesiones macroscópicas y microscópicas estudiadas y observadas, son lesiones características de infección por *Coronavirus* y *Rotavirus* a nivel intestinal; siendo candidatos para realizar inmunohistoquímica.
- Al no existir esquemas de evaluación de lesiones microscópicas reportadas en pequeños rumiantes, el empleo de esquemas de evaluación realizado en modelos murinos es confiable, ya que ayuda a establecer que tan patógenos pueden ser los agentes infecciosos, y la gravedad de las lesiones, así también para homogenizar una batería de información cuantitativa para el estudio patológico de las enfermedades infecciosas entéricas en rumiantes. Sin embargo, la estandarización directamente en pequeños rumiantes ajustaría muchas líneas de investigación.
- En el síndrome diarreico en corderos y cabritos hubo participación de *Rotavirus* y/o *Coronavirus*, y de agentes bacterianos tales como *Escherichia coli*; parasitarios: estrongiloides, y protozoarios compatibles con el género *Eimeria* spp y *Cryptosporidium* spp.
- Este es el primer estudio cualitativo en México que demuestra la presencia de *Coronavirus* y *Rotavirus* por inmunohistoquímica en corderos y cabritos con edades entre 0 a 120 días con síndrome diarreico en secciones de intestinos.
- Finalmente, este estudio destaca la gran importancia de la remisión de muestras al laboratorio de patología, bacteriología y parasitología ya que esté material es de ayuda para generar estudios de éste carácter, que directamente, ayuda a comprender la epidemiología de *Rotavirus* y *Coronavirus* en diarreas neonatales, que a largo plazo permite avanzar y pensar a futuro, con estudios de investigación que impacten al sector productivo positivamente y mejoren el bienestar animal, tal como identificar más a fondo estos patógenos para posteriormente generar vacunas.

REFERENCIAS.

Arias CF, Ayala SD, Isa P, Salinas DMA, López S. 2016. Rotavirus attachment, internalization, and vesicular traffic. En: Viral Gastroenteritis. Molecular epidemiology and pathogenesis. United Kingdom. Academic Press. Chapter 2.2. p. 103 – 119.

Avendaño FL. Infecciones virales respiratorias. 2012. Virología clínica. Santiago de Chile. Mediterraneo. Capítulo 12. Sección II. P. 117 – 121.

Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR. 2012. Mechanism of coronavirus prefusion spike. *Viruses* 4 (6); 1011 – 1033.

Berrios P, Celedon MO, Ramirez V. 1988. Rotavirus en ovinos: detección mediante ELISA y aislamiento en cultivos celulares MA-104. *A Micro Vet*; 20: 108-12.

Bok M, Alassia M, Frank F, Vega GC, Wigdorovitz A, Parreño V. 2017. Passive immunity to control Bovine coronavirus diarrhea in a dairy herd in Argentina. *Rev A Micro*; 50. p. 23 – 30.

Burimuah V, Sylverken A, Owusu M, El-Duah P, Yeboah R, Lamptey J, Frimpong OY, Agbenyega O, Folitse R, Tasiame W, Emikpe B, Owiredu WE, Oppong S, Adu-Sarkodie Y, Drosten C. 2020. Sero-prevalence, cross-species infection and serological determinants of prevalence of Bovine *Coronavirus* in cattle, sheep and goats in Ghana. *V Micro*; 241; 108544. 0378 – 1135; 1 – 6.

Cardiel GI, Jiménez FM, Luján L, Buesa J, Espada J, Fantova E, Blanco J, Segalés J, Badiola JJ. 2011. Novel group A *Rotavirus* G8 P[1] as primary cause of an ovine diarrheic syndrome outbreak in weaned lambs. *V Micro*; 0378 – 1135. 149: p. 467 – 471.

Cook N, Bridger J, Kendall K, Gomara IM, Attar EL, Gray J. 2004. The zoonotic potential of rotavirus. *J Infect*; 48: 0163 – 4453. p. 289 – 302.

Chambers P, Pringle CR, Easton AJ. 1990. Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *J G Virol*; 71: 3075 – 3080.

Chen F, Knustson PT, Ciarlet M, Sturos M, Martella GD. 2018. Complete genome characterization of a rotavirus B (RVB) strain identified in Alpine goat kids with enteritis reveals inter-species transmission with RBV bovine strains. *J G Virol*; 1022: p. 1 – 7.

Christine B, Navarrete AN, Baird and Pugh DG. 2012. Diseases of gastrointestinal system. Sheep and goat medicine. 2nd. USA. Elsevier; Chapter 5. P. 84 – 97.

Durham P, Stevenson B, Farquharson B. 1979. *Rotavirus* and *Coronavirus* associated diarrhoea in domestic animals. N Z Vet J; 27, 30 – 32.

Eisa, M, Mohamed, A. 2004. Role of enteric pathogens in enteritis in lambs, goat kids and children and their zoonotic importance. Vet M J G; 52, 41–59.

Erben U, *et al.* 2014. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. I J E Pathol; 8: 1936-2625. P. 1 – 21.

Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Woode GN, Bridger JC and Derrick JM. 1974. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. Lancet II; P. 61 – 63.

Gazal S, Mir AI, Iqbal A, Taku KA, Kumar B, Bhat AM. 2011. Ovine rotaviruses. O Vet J; 1: 2218 – 6050. P. 50 – 54.

Gelberg BH. 2017. Alimentary system and the peritoneum, omentum mesentery and peritoneal cavity. James F. Zachary, Pathologic basis of veterinary disease. 6th. Missouri. Elsevier; Chapter 7. Section 2. p. 374 – 375.

Gumusova O, Yazici Z, Albayrak H, Cakiroglu D. 2007. First report of bovine *Rotavirus* and bovine *Coronavirus* seroprevalence in goats in Turkey; Vet G. 61, 75 -79.

Holland RE. 1990. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. C Micro; Rev. 3. 345 – 375.

Kaminjolo SJ, Adesiyun AA. 1994. Rotavirus infection in calves, piglets, lambs and goat kids in Trinidad. B Vet J; 150. 030293-7. 293 – 299.

Kaoru MJ, Whittaker RG. Host cell proteases: 2015. Critical determinants of *Coronavirus* tropism and pathogenesis. V R; 202: 0168 – 1702; 10.1016. 120 – 134.

Kashyap G, Singh R, Malik YS, Agrawal RK, Singh KP, Kumar P, Sahoo M, Gupta D, Singh R. 2018. Experimental bovine rotavirus-A (RV-A) infection causes intestinal and extra-intestinal pathology in suckling mice. Micro P; 121: 0882 – 4010. p. 22 – 26.

Maciel FJ, Matter BL, Tasca C, Sheid RAD, Gresler TL, Ziech ER, Vargas CA, 2019. Characterization of intestinal *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea due to rotavirus and coronavirus. J M Micro; 68: 417 – 423. P. 417 – 423.

MacLachlan NJ, Duboi JE, Barthold WS, Swayne ED, Winton RJ. 2017. Fenner`s veterinary virology. 7th ed. London; Elsevier. Chapter 15, Reoviridae; p.300 – 319.

Martella V, Decaro N, Buonavoglia C. 2015. Enteric viral infections in lambs or kids. *Veterinary Microbiology*; 181: 154 – 160. 8.0, Rotaviruse; p. 157.

Matthews J. Diarrhoea. 2016. *Diseases of the Goat*. 4th, Jhon Wiley. USA. Chapter 14. P. 204 – 216.

Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo EA, Iturriza GM, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van RM. 2008. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strain and human DS-like and bovine rotavirus strains. *J Virol*; 82: 3204-19.

Mohebbi MR, Loftollahzadeh S, Madadgar O, Dezfouli MM. 2017. A survey on detection of *Coronavirus* in neonatal calf diarrhea in dairy farms of Iran. *Iranian J V Med*. Vol. 11; N°3. 201 – 208.

Muñoz M, Álvarez M, Lanza I, Cármenes P. 1996. Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. *E Infec*; 117: 203 – 211; p. 203 – 211.

Nagy B, Bozso M, Palfi G, Nagy MA. 1984. Studies on cryptosporidial infection of goat kid. *Colloque international*; 28: 443 – 451.

Ozmen O, Haligur M, Aydogan A, Demir N. 2018. Immunohistochemical detection of viral etiopathogenesis in lambs and goat kids with neonatal diarrhea. *A S Vet*; 46: 1679 – 9216; p. 1 – 8.

Ozmen O, Yukari BA, Halugur M, Sahinduran. 2006. Observations and immunohistochemical detection of coronavirus, *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in diarrhoea in lambs and kids. *O*; 148: 357 – 364; p. 357 – 364.

Papp H, Malik SY, Farkas SL, Jakab F, Martella V, Bányai K. 2014. Rotavirus strains in neglected animal species including lambs, goats and camelids. *V Dis*; 25: 014 – 02032. p. 215 – 222.

Park JS, Kim YG, Choy EH, Hong JY, Saif JL, Jeong HJ, Park IS, Kin KS, Shin SS, Kang IM, Cho OK. 2007. Dual enteric and respiratory tropism of Winter Dysentery bovine coronavirus in calves. *A Virol*; 152: 1885 – 1900. P. 1885 – 1900.

Pass DA, Penhale WJ, Wilcox GE, Batey RG. 1982. Intestinal coronavirus-like particles in sheep with diarrhea. *V Rec*. 111; 106 – 107.

Peréz GA. 2016. Diagnóstico inmunohistoquímico de enteropatías causadas por *Coronavirus* y *Rotavirus* en becerras. UNAM. 132.248.195. 80. Recurso en Linea: <http://132.248.9.195/ptd2016/junio/0745605/Index.html>.

Ramig FR. 2004. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *Journal of virology*; 19. p. 10213 – 10220.

Reinhardt G, Zamora J, Tadich N, Polette M, Aguilar M, Rodermann S. 1995. Diagnosis of *Coronavirus* in sheep in Valdivia province, X region, Chile. *A M Vet*; 27, 129 – 132.

Salihi AK. 2018. Diagnosis of viral causative agents in neonate small ruminant using rapid card test. *M R S Vet*; Feb 2018; 7: 2307 – 8073. p. 40 – 46.

Schoenian S. Diarrhea (scours) in small ruminants. 2012. *Comp Ext J Maryland University*. 2007. <http://www.sheepandgoat.com/articles/scours.html>.

Shabana II, Bouqellah NA, Zanaket H. 2017. Investigation of viral and bacterial enteropathogens of diarrheic sheep and goats mind Medina Saudi Arabia. *T Biomed*; 34. P. 944 – 955.

Singh DD, Rajveer SP, Gururaj K, Gangwar KN, Mishra KA, Andani D, Singh KM, Bhushan S, Kumar A. 2018. Molecular detection of *Clostridium perfringens* toxinotypes, Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Rotavirus* and *Coronavirus* in diarrheic fecal samples of neonatal goat kids. *V S Archiv*; 88, 161027: p. 1- 20.

Singh S, Singh R, Singh KP, Malik YPS, Kamdi B, Singh R, Kashyap 2020. Immunohistochemical and molecular detection of natural cases of bovine rotavirus and coronavirus infection causing enteritis in dairy calves. *Micro P, Elsevier*; 138. 0882-4010. P. 1 – 6.

Singh U, Singh R, Singh PA, Yadav KS, Sircar S, Malik SY. 2017. Detection and characterization of caprine and ovine rotaviruses, India. *I J A Sci*; 87: 1338 – 1361. P. 66 – 69.

Snodgrass DR, Angus WK, Gray WE. 1977. Rotavirus infection in lambs: pathogenesis and pathology. *A of Virol*; 55. p. 263 – 274.

Snodgrass DR, Herring AJ, Campbell I, Inglis JM, Hargreaves FD. 1984. Comparison of atypical rotaviruses from calves, piglets, lambs and man. *J G Virol*; 65: 909 – 914.

Snodgrass DR, Herring J, Reid H, Scott F, Gray E. 1980. Virus infection in cattle and sheep in Scotland 1975 – 1978. *V Rec*; 106, 193 – 195.

Snodgrass DR, Smith LM, Krautil LF. 1982. Interaction of *Rotavirus* and enterotoxigenic *Escherichia coli* in conventionally-reared dairy calves. *V Micro*; 0378 – 1135. 7; 51 – 60.

Theil WK, Grooms CM, McCloskey DR, Redman R. 1995. Group B rotavirus associated with an outbreak of neonatal lamb diarrhea. *J V Di Invest*; 7: 148 – 150.

Tråvén M, Carlsson U, Lundén A, Larsson B. 1999. Serum antibodies to bovine coronavirus in Swedish sheep. *A V Scand*. 40, 69 – 74.

Tzipori S, Sherwood D, Angus WK, Campbell I, Gordon M. 1981. Diarrhea in lambs: Experimental Enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Rotavirus*, and *Cryptosporidium* spp. *I Immun*. Vol. 33. N° 2. 401 – 406.

Tzipori S, Walker M. 1978. Isolation of rotavirus from foals with diarrhoea. *B Commun*; 56: Pt.4. p. 453 – 457.

Underwood JW, *et al.*, 2015. Biology and Diseases of Ruminants (Sheep, Goats and Cattle). En: *L A Med*. 3rd. USA. Elsevier. Chapter 15. P. 667 – 680.

Uzal FA, Plattner BL, Hostetter JM. 2016. Alimentary System. En *Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer NC. P D Anim*. 6th. USA. Elsevier. Chapter 1. Vol. 2. P. 149 – 156.

Wang Y, Zhang H, Zhu L, Xu Y, Liu N, Sun X, Hu L, Huang H, Wei K, Zhu R. 2018. Dynamic distribution of gut microbiota in goats at different ages and health states. *F Micro*; 10.3389; 2509. Vol. 9. 1 – 10.

Wani SA, Bhat MA, Ishaq SM. 2007. Molecular epidemiology of rotavirus in calves and lambs with diarrhoea in Kashmir valley. *I J Virol*; 18 (1): 17–19.

Yilmaz V, Timurkan OM, Coskun N, Yildirim Y. 2017. Investigation of *Rotavirus* infection in sheep using serological and molecular techniques. *I J Anim. Res*. 2017. 51, 0976 – 0555; 525 – 530.