

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“FRECUENCIA DE ROTAVIRUS Y CORONAVIRUS EN
EL SINDROME DE LA DIARREA INDIFERENCIADA DE
LAS BECERRAS EN LA CUENCA LECHERA DE
DELICIAS, CHIHUAHUA”**

POR:

ARACELI SÁNCHEZ GÓMEZ

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAH., MÉXICO

NOVIEMBRE 2008

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“FRECUENCIA DE ROTAVIRUS Y CORONAVIRUS EN EL SINDROME DE
LA DIARREA INDIFERENCIADA DE LAS BECERRAS EN LA CUENCA
LECHERA DE DELICIAS, CHIHUAHUA”**

POR:

ARACELI SÁNCHEZ GÓMEZ

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ASESOR

M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZALEZ

TORREÓN, COAH., MÉXICO

NOVIEMBRE 2008

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**"FRECUENCIA DE ROTAVIRUS Y CORONAVIRUS EN EL SINDROME DE
LA DIARREA INDIFERENCIADA DE LAS BECERRAS EN LA CUENCA
LECHERA DE DELICIAS, CHIHUAHUA"**

APROBADA POR EL COMITÉ DE TESIS

PRESIDENTE DEL JURADO


M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GÓNZALEZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL


M.C. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELIAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA

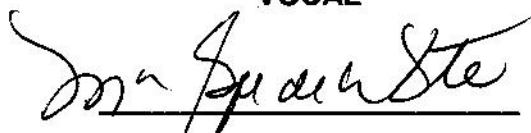
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

“FRECUENCIA DE ROTAVIRUS Y CORONAVIRUS EN EL SINDROME DE
LA DIARREA INDIFERENCIADA DE LAS BECERRAS EN LA CUENCA
LECHERA DE DELICIAS, CHIHUAHUA”

PRESIDENTE


M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ


M.V.Z. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

VOCAL

M.S.P MA. GUADALUPE DE LA FUENTE SALCIDO

VOCAL SUPLENTE


M.V.Z. LUIS JAVIER PRADO ORTÍZ

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios: Por darme la vida y permitirme realizar cada uno de los sueños que hasta el día de hoy he tenido, uno de ellos el ver culminada mi preparación profesional.

A mi familia: Por ser siempre un gran apoyo, por ayudarme a ser mejor persona y por darme cada uno a su manera su cariño; gracias a mi mamá la Señora María Gómez Triana por enseñarme que de nada sirve tener solo las ganas de hacer algo, sino que es necesario aplicar una buena dosis de esfuerzo para conseguirlo, a mi papá Sr. Isaías Sánchez Vaquera (f) porque tu me enseñaste a tener siempre el deseo de aprender más por medio de la lectura, a mis hermanos Gabriel y Rocío Sánchez Gómez por haberme impulsado a hacer algo más cada uno a su manera.

A mi cuñada Karina Morales gracias por tus palabras de aliento, siempre me ayudaron.

Obviamente a mi maravillosa y generosa “Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro”, gracias a ti por ser un semillero de ilusiones y por cobijarnos este tiempo,
ALMA TERRA MATER,

A Rafael Pineda Ramos por andar este camino conmigo, por cada enseñanza que obtuve de ti y por convertirte en alguien tan especial en mi vida.

A mis amigas Sara Aguirre, Marisol Hermosillo, América Arellano son y serán siempre muy importantes en mi vida, por todo lo que vivimos.

A cada una de las personas que conocí en esta universidad, me llevo lo mejor de cada uno de ustedes, a mis compañeros con los que conviví durante 5 años fue grato.

A cada Maestro que me impartió clases, de cada uno aprendí algo...de unos como ser un buen Médico Veterinario Zootecnista y de otros que no debe de hacer un buen MVZ

A mis asesores de tesis: M.V.Z. J. Guadalupe Rodríguez Martínez por exigirme ser mejor estudiante y enseñarme a no conformarme a ser como el promedio, M.V.Z. Luis Javier Prado Ortiz, M.S.P Ma. Guadalupe De La Fuente Salcido por su ayuda en la realización de este trabajo y especialmente al M.C.V. Ramón Alfredo Delgado González por su apoyo no solo en este trabajo sino por todas sus enseñanzas, es un gran profesor, fue un placer trabajar con usted, mi cariño y sincera admiración por no dejarse llevar y no perder nunca ese deseo de formar mejores Médicos como lo hizo conmigo.

Tal vez suene ridículo pero también gracias a cada mascota que he tenido a lo largo de mi vida, me motivaron, me hicieron y siguen haciendo muy feliz, algunas de ustedes hasta participaron en mi formación profesional.

DEDICATORIA

A ti que ya no estas conmigo y no puedes ver la culminación de este sueño...a ti..por que en ningún momento dude de que mi vocación..el amor y la pasión por esta carrera la herede de ti...no puede haber sido de nadie más.

Solo tu entendías cuando yo sufría al ver un animal enfermo, desvalido....y claro que tu eras quien a escondidas me ayudabas a darle acilo y mitigar un poco su hambre y su dolor....a ti...un hombre que marco mi vida de muchas formas...a ti Papa. Lo logre y aunque tu ya no te des cuenta se termino esta etapa.

Mamá: Este logro te pertenece por cada año que haz trabajado para que este día llegara, por no darte por vencida ante nada.

A mi pequeña sobrina Sofía: me haces muy feliz princesa y cuando supe que venías en camino fuiste una luz que se encendió en mi vida y me motivaste a ser mejor persona.

A mi hermosa universidad por que gracias a ti logre una de mis grandes anhelos ser Médico Veterinario Zootecnista.

A la sociedad mexicana con quién a partir de hoy tengo el compromiso de ser un agente de cambio en la producción pecuaria.

INDICE

	Pagina
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	iii
RESUMEN	iv
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
Historia	2
Etiología	4
Transmisión y patogenia	6
Lesiones	9
Diagnostico	10
Control y vacunación	13
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVO ESPECÍFICO	14
HIPÓTESIS	14
JUSTIFICACIÓN	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	19
LITERATURA CITADA	22

INDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1.	18
Figura 2.	18

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	19
------------------	-----------

RESUMEN

La diarrea indiferenciada de las becerras es un cuadro clínico caracterizado por heces líquidas y profusas, deshidratación, causado por la interacción de varios agentes patógenos. En la Ciudad de Delicias, Chihuahua no existen estadísticas de estos trastornos, por este motivo se tomaron 21 muestras de heces de becerras con diarrea directamente del recto, de 7 establos lecheros, con la finalidad de identificar antígeno de rotavirus y coronavirus, se depositaron en bolsas de plástico estériles y se transportaron en refrigeración al laboratorio para procesarlas, utilizando un método de análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), disponible comercialmente, y se analizaron de acuerdo a las especificaciones de la prueba realizándose así el diagnóstico. Los 7 (100%) establos estudiados presentaron problemas infecciosos gastrointestinales manifestados con diarrea. Se obtuvo un 57.14% (12/21) de heces positivas a la presencia de antígeno de rotavirus y 14.28% (3/21) para coronavirus.

Palabras clave: Diarrea indiferenciada de las becerras, Rotavirus, Coronavirus.

INTRODUCCIÓN

La diarrea indiferenciada de las becerras es una manifestación muy frecuente que se caracteriza por la presencia de heces líquidas y profusas, deshidratación, emaciación, postración y muerte y es causadas por infecciones por *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Cryptosporidium parvum*, rotavirus y coronavirus, entre otros agentes (Delgado 2000).

EL rotavirus es uno de los principales agentes causales de enfermedades diarreicas en niños y animales jóvenes de todo el mundo (Paul *et al.*, 1992; Saif *et al.*, 1994; Kapikian *et al.*, 1996). En explotaciones bovinas las infecciones por rotavirus usualmente ocurren como infección enzoótica que afecta a más del 60% de la población de terneros (Paul *et al.*, 1992; Saif *et al.*, 1994). La mayoría de las infecciones naturales con rotavirus son subclínicas o están asociadas a diarreas moderadas. Sin embargo, muchas infecciones están asociadas con gastroenteritis moderada a severa (Woode, 1986; Paul *et al.*, 1992).

El coronavirus bovino es un importante agente patógeno del ganado bovino, el cual está asociado a síndromes clínicos diferentes como es el respiratorio, digestivo, hepatitis, trastornos nerviosos, nefritis y enteritis, caracterizándose de forma general por una rápida diseminación, afectando tanto a individuos jóvenes como adultos, siendo responsable de grandes pérdidas económicas anualmente a nivel mundial (Storz *et al.*, 1996). La enfermedad de manera natural cursa con diarreas líquidas profusas que pueden persistir durante 2 a 6 días, anorexia, fiebre y deshidratación; en algunos terneros se puede observar presencia de sangre en heces. La morbilidad y mortalidad son altas y terneros con diarreas sanguinolentas pueden experimentar una hipovolemia a pocas horas de haber comenzado los signos clínicos (Mc. Arthur, 1997).

El periodo de incubación puede variar de 2 a 8 días en los animales afectados de forma más grave (Espinasse *et al.*, 1990). La incidencia de diarrea de forma explosiva con surgimiento de los síntomas se aprecia entre el 10 a 15% de los animales en el primer día, el segundo día del 20 a 40% de los animales son

afectados hasta alcanzar el 100% del hato; típicamente dentro de dos semanas del inicio de la diarrea, todos los animales se recuperan; en grandes hatos la duración se puede prolongar de 6 a 8 semanas (Heckert *et al.*, 1991). Un porcentaje de alrededor del 4% de las becerras, llegan a morir antes del destete y otro porcentaje no se desarrolla correctamente (Losinger 1997).

De acuerdo a estos antecedentes y considerando que hay escasa información sobre estas patologías en México, además de que en la cuenca lechera de Delicias, Chihuahua no existen estadísticas sobre estos trastornos, se llevó a cabo el presente estudio para analizar la frecuencia de Rotavirus y Coronavirus

ANTECEDENTES

Historia

La primera notificación de coronavirus ocurrió en 1972 en los Estados Unidos de América, asociado a una enfermedad entérica de los terneros neonatos, en un síndrome diarreico neonatal de los terneros (Mebus *et al.*, (1972); el virus fue aislado de heces fecales diarreicas de terneros gnotobióticos inoculados experimentalmente, se detectó por medio de microscopía electrónica y se caracterizó morfológicamente dentro del grupo de los coronavirus (Stair *et al.*, 1972); posteriormente Mebus *et al.* (1973) lograron el aislamiento del virus en cultivo primario de riñón de embrión bovino (Mebus *et al.*, 1973a).

En el año de 1975 en Nueva Zelanda se relacionó al coronavirus bovino con un síndrome diarreico del ganado bovino adulto denominado Disentería de Invierno (Horner *et al.*, 1975), aunque esta relación permaneció como un enigma durante algunos años, fue reportado por varios investigadores en diversos países (Campbell y Cookingham, 1978; Clark, 1993; Van Kuiningen *et al.*, 1995), y fue aclarado en estudios subsiguientes (Smith *et al.*, 1998; Tsunemitsu *et al.*, 1999), reconociendo al coronavirus como el principal agente etiológico de la Disentería de Invierno (Cho *et al.*, 2001; Saif, 2002; Hasoksuz *et al.*, 2002a; Hasoksuz *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2005a).

Además de infectar el sistema digestivo provocando trastornos entéricos, el coronavirus bovino también posee tropismo por el tracto respiratorio de donde ha sido recuperado a partir de animales convalecientes de enfermedad respiratoria (McNulty *et al.*, 1984; Reynolds *et al.*, 1985; Saif *et al.*, 1986).

En la década de los noventa Storz *et al.* (1996) comunicaron el aislamiento del coronavirus bovino a partir de muestras de secreciones nasales de bovinos jóvenes con signos respiratorios después de la transportación, no siendo hasta el año 2000 cuando se demostró a través de los postulados de Evans su asociación con la Fiebre de Embarque (Storz *et al.*, 2000a); ratificado en ese mismo año cuando Store *et al.*,(2000b) reportaron que el coronavirus fue el virus aislado con mayor frecuencia al estudiar dos epizootias de Fiebre de Embarque en más de 100 bovinos.

En la actualidad, el coronavirus bovino resulta endémico en un gran número de países de Europa (Jactel *et al.*, 1990; Hartel *et al.*, 2004; Dringeliene y *et al.*, 2004), Asia (Takamura *et al.*, 2002; Jeong , *et al.*, 2005b), Oceanía (Beer, 1983) y América (Dea *et al.*, 1995; Jerez *et al.*, 2002), por lo que puede admitirse su difusión a nivel mundial.

El rotavirus bovino Grupo A fue identificado, caracterizado y confirmado como agente causal de diarreas en terneros, por primera vez, por Mebus y col. en 1969.

Actualmente es considerado el principal agente patógeno productor de diarreas en terneros menores de tres semanas de vida, en todo el mundo. Respecto de los otros grupos de rotavirus, se ha reportado la circulación de rotavirus grupo B y C en bovinos de Japón y Estados Unidos el rotavirus grupo B ha sido detectado en terneros y esporádicamente asociado con diarrea neonatal pero se encuentra especialmente involucrado en brotes de diarrea epizoótica en ganado adulto; el rotavirus grupo C fue aislado a partir de un caso de diarrea en bovinos adultos en Japón (Mebus *et al.*, 1995).

Dentro de los rotavirus del grupo A que circulan en bovinos se han reportado los G-tipos: G1, G2, G3, G6, G8, G10, G11 y los P-tipos: P[1], P[5] y P[11],

siendo las cepas UK o IND (P[5]G6), NCDV-Lincoln (P[1]G6), y B223 (G10P[11]) los tipos predominantes a nivel mundial. Seguido por P[1]G8 que ha sido reportado recientemente en Europa y Japón (Campbell y Cookingham, 1978; Clark, 1993; Van Kuiningen *et al.*, 1995).

Estudios realizados en Argentina durante un período de 8 años (1992-1999) indican que las diarreas por rotavirus representan una de las principales afecciones de los terneros neonatos, alcanzando una prevalencia de 87% en hatos de crianza y de 74% en otros establecimientos, con una amplia circulación de G6 (32.6%), seguido de G10 (15.4%) (Takamura *et al.*, 2002; Jeong *et al.*, 2005b).

Etiología

El Coronavirus es un virus ARN, envuelto; ubicado taxonómicamente dentro de la familia Coronaviridae, género Coronavirus y orden Nidovirales (González *et al.*, 2003); y clasificado en el segundo grupo de los tres en que se dividen los coronavirus (Knipe *et al.*, 2001; Brandao *et al.*, 2001), en el cual se incluyen además Coronavirus respiratorio humano OC43, Virus de la hepatitis murina, Virus de la sialodacrioadenitis y Virus de la encefalomiелitis hemoaglutinante porcina; con los cuales está muy relacionado desde el punto de vista de sus secuencias nucleotídicas y reacciones serológicas (Saif, 2004).

A principio del año 2000 se reportó el hallazgo de un nuevo coronavirus, el cual resultó ser el agente etiológico del síndrome respiratorio agudo severo (SARS); sin embargo, este nuevo virus no pertenece a ninguno de los tres grupos reportados hasta el momento (Ksiazek *et al.*, 2003; Rest y Mindell, 2003), lo que incrementa el interés por conocer las propiedades de los coronavirus.

En suspensiones purificadas de coronavirus bovino se han observado consistentemente al microscopio electrónico partículas esféricas, con un diámetro de alrededor de 120 nm, apreciándose en la superficie proyecciones dispersas uniformemente, en forma de corona, con un diámetro de alrededor de 12 a 24 nm. Una envoltura lipoproteica rodea la cápside, de simetría

helicoidal, que posee un diámetro aproximado de 14 a 16 nm (Brandao *et al.*, 2003).

Debido a la presencia de lípidos esenciales en la envoltura viral el virus se inactiva rápidamente con solventes orgánicos como éter, cloroformo y deoxicolato de sodio, además con detergentes, como Nonidet P-40. La infectividad es estable a pH 3. El coeficiente de sedimentación de la cepa Mebus y LY-138 es de 1.18-1.20g/mL en sacarosa y de 1.24-1.25 g/mL en solución CsCl (Mebus, 1990).

Sharpee *et al.* (1976) junto con Soto *et al.*, (1977) investigando sobre la termosensibilidad del virus plantearon que este virus puede permanecer en congelación un tiempo muy largo, incluso a -20°C puede resistir más de dos años; sin embargo al calentarlo a 50°C durante 60 minutos se produjo una inactivación total, lo que puede ser prevenido cuando se incluye MgCl₂ en el medio durante la incubación.

La supervivencia del virus en la naturaleza es muy baja; a temperatura ambiente el virus disminuye tres logaritmos su título durante un período mayor de 10 días, siendo extremadamente sensible a altas temperaturas y a las radiaciones solares (Growes, 1982). Se inactiva en fenol al 0.5%, formalina 0.05%, ambos en 30 minutos. La sosa cáustica al 2% lo destruye rápidamente, también muestran una rápida inactivación por la luz ultravioleta (Mebus, 1990).

En cuanto a los rotavirus son clasificados dentro de la familia Reoviridae y son caracterizados por la presencia de una triple cápside viral y el genoma viral está compuesto por 11 segmentos de ARN doble cadena (Mattion *et al.*, 1994).

Basados en la especificidad de la VP6 localizada en la cápside interna del virus, los rotavirus pueden ser clasificados dentro de siete serogrupos distintos, denominados A, B, C, D, E, F y G. Las dos proteínas de superficie externa, VP4 y VP7, son responsables para activar anticuerpos de neutralización contra el virus. Un sistema binario es usado para clasificar los rotavirus del grupo A basados en la VP4 (P-tipos) y VP7 (G-tipos) específicamente (Estes *et al.*,

1989). Muy pocos estudios se han realizados sobre la prevalencia y distribución de serotipos de rotavirus bovinos (Bridger, J. C. 1994).

En la actualidad las cepas que pertenece al grupo A de rotavirus porcino que corresponden al serotipo G son: 1, 3, 4, 5, 9, 10 y 11 (Bohl *et al.*, 1984; Nagesha *et al.*, 1988; Ciarlet *et al.*, 1994; Pongsuwanna *et al.*, 1996; Rach *et al.*, 2000) han sido detectados. Dentro de los RV grupo A que circulan en bovinos se han reportado los G-tipos: G1, G2, G3, G6, G8, G10 y G11 (Gouvea *et al.*, 1994; Falcone *et al.*, 1999).

Transmisión y Patogenia

El coronavirus ingresa en el organismo normalmente por ingestión o inhalación. Cuando la puerta de entrada es la vía enterógena el virus infecta las células epiteliales del intestino delgado y el colon, donde hace una replicación local, la cual produce atrofia de las vellosidades; debido a esto las enzimas situadas en la superficie de las células epiteliales, especialmente las del intestino delgado no degradan de manera eficiente al alimento ingerido (Mebus, 1990).

La degeneración de las células epiteliales provocadas por el virus causan una absorción insuficiente de agua y electrolitos e incrementan la función secretora y con ello se desencadena el cuadro clínico de la diarrea, lo que lleva a la deshidratación, acidosis e hipoglicemia; pudiendo provocar la muerte, sobre todo en terneros (Mc. Arthur, 1997).

En individuos recuperados de la infección las criptas del epitelio de la mucosa intestinal pueden recuperarse y eventualmente volver a su funcionamiento fisiológico (Espinasse *et al.*, 1990). En estudios realizados por Mebus, (1990) durante las primeras horas de las diarreas las heces fecales pueden contener 10^{10} partículas infectivas por mL.

Cuando la puerta de entrada es por las vías respiratorias el virus infecta el epitelio respiratorio, fundamentalmente a nivel de vías superiores (Mc. Arthur, 1997), diseminándose desde el punto de entrada hacia las regiones vecinas,

ocasionando una inflamación de las vías respiratorias altas y/o una conjuntivitis (Storz *et al*, 2000a).

Storz *et al*. (2000b) aislaron el virus a partir de fragmentos de pulmones de individuos con enfermedad respiratoria, encontrando entre 1×10^3 y 1.2×10^7 unidades formadoras de placas por gramo de tejido pulmonar.

En relación al rotavirus la infección se produce en los individuos jóvenes de las diferentes especies animales y se encuentra asociada con diarrea acuosa no enterocolítica y lesiones intestinales. Rotavirus bovino genera diarrea en terneros menores de 3 semanas de vida, y la edad de máxima susceptibilidad se registra entre los 2 y 19 días de edad. La transmisión se produce principalmente por la vía fecal-oral y los animales infectados eliminan grandes cantidades de virus (10^{10} partículas virales por gramo de heces) (Bridger, 1994).

Estudios de la infección realizados en terneros descolostrados, gnotobióticos o convencionales indican que la diarrea se desarrolla dentro de un corto período de incubación de 18 a 24 horas posteriores a la inoculación oral. Según la carga viral y la virulencia de la cepa, la diarrea puede ser leve y autolimitada, o severa con una importante pérdida de fluidos y desbalance electrolítico. (Bridger, 1994; Jaynes *et al.*, 2004).

Las heces de los terneros afectados son blanco-amarillentas, su consistencia varía de pastosa a extremadamente acuosas, y presentan un olor fétido característico. Otros signos clínicos incluyen depresión, anorexia y deshidratación. Los Rotavirus infectan selectivamente los enterocitos maduros localizados en la porción apical de las microvellosidades intestinales. Las criptas no son afectadas. Los enterocitos son invadidos por el virus, que se replica rápidamente y provoca la lisis celular y la atrofia de las vellosidades. Los cambios en la mucosa pueden ser leves o graves (Bridger *et al.*, 1985).

En los casos leves, las lesiones se presentan formando parches en el epitelio e incluyen acortamiento de las vellosidades y una leve infiltración de la lámina propia con células mononucleares (Ahmed *et al.*, 2004).

En los casos graves, se produce un total acortamiento de las vellosidades, una marcada infiltración de células inflamatorias, hipertrofia de las criptas y daño severo del epitelio que incluye degeneración, vacuolización, necrosis y descamación de las células infectadas (Bridger *et al.*, 1982).

En un estudio comparativo donde se infectaron experimentalmente terneros gnotobióticos de 1 o 10 días de edad, se observó que la replicación viral se extiende uniformemente a lo largo de todo el intestino delgado afectando principalmente entre el 40% y 65% del extremo proximal, en los terneros más jóvenes; mientras que los terneros mayores presentaron la infección en parches que afecta la zona media y distal (Chang *et al.*, 1997). Un hallazgo importante fue que en ambos grupos de terneros se detectó la presencia de enterocitos infectados por rotavirus en el ciego y el colon, indicando que la infección puede extenderse al intestino grueso, al menos en esta especie (Chang *et al.*, 1997).

A medida que progresa la infección, las células infectadas son reemplazadas por células cuboidales inmaduras y secretoras de las criptas, incapaces de cumplir con las funciones normales de digestión y absorción, por lo que disminuye el transporte de glucosa asociado al sodio, se registran niveles anormalmente bajos de maltasa, sacarasa y lactasa, los que vuelven a la normalidad luego de 4 a 8 semanas post-infección (Millane *et al.*, 1995). La mayoría de los individuos con gastroenteritis aguda por rotavirus padecen mala absorción de lactosa e intolerancia. La lactosa de la leche no digerida favorece el desarrollo bacteriano y ejerce un efecto osmótico que contribuye al desarrollo de la diarrea (Bridger *et al.*, 1985). Esta serie de hechos provocan la pérdida de electrolitos y fluidos, que ocasionalmente llevan a la deshidratación severa y muerte (Brown *et al.*, 1987). Los mecanismos propuestos en el desarrollo de diarrea por rotavirus incluyen: malabsorción, como resultado de la disfunción y destrucción de los enterocitos; efecto enterotóxico causado por la proteína viral NSP4 y la activación de un sistema neuroentérico. Investigaciones recientes indican que la proteína NSP4, péptido glicosilado que participa en la morfogénesis viral, induce diarrea en ratones lactantes al ser administrado por vía intraperitoneal o intraduodenal (Eiden *et al.*, 1992). La NSP4 actúa en los

estadios tempranos de la infección viral promoviendo la movilización de calcio hacia el interior de los enterocitos infectados con la consiguiente secreción de fluidos que provoca la alteración del balance hídrico y electrolítico. También se postula que la infección por rotavirus produce la activación de terminales nerviosas en la pared intestinal generando un aumento del peristaltismo y de la secreción de agua fomentando la diarrea acuosa (Eiden *et al.*, 1992).

Lesiones

A lo largo del intestino se puede observar dilatación, flacidez y aumento del contenido intestinal líquido de color amarillo; los terneros muestran signos de deshidratación, también se observan con frecuencia trastornos circulatorios, básicamente congestión y hemorragias petequiales en ciego y colon; los linfonódulos mesentéricos se observan aumentados de tamaño (Mebus *et al.*, 1973b). Durante la infección natural usualmente pueden aparecer otras lesiones producto de infecciones mixtas (Langpap *et al.*, 1979; Mebus, 1990).

Cuando la enfermedad progresa las células del epitelio del intestino delgado y del colon cambian por células cuboidales con presencia de vacuolas y las células vecinas se ven fusionadas, lo que termina con la destrucción del epitelio, mostrándose una marcada atrofia (Mebus, 1990; Kapikian, 1994).

En estudios realizados por Garwes (1982), se cuantificó la atrofia producida en el intestino delgado, apreciándose una relación de 1 en los individuos inoculados experimentalmente con coronavirus bovino comparado con los controles en los cuales el valor de esta relación fue de 5.3.

Las lesiones microscópicas en bovinos adultos son más evidentes en el colon donde las criptas del epitelio exhiben degeneración, necrosis y atrofia; también se aprecian con frecuencia hemorragias petequiales, que pueden observarse también a lo largo de la mucosa del intestino delgado (Beer, 1983).

En el tracto respiratorio las lesiones pueden extenderse hasta la parte posterior de la cavidad nasal; en la tráquea se observa congestión, hemorragias

petequiales y exudado serofibrinoso (Espinasse *et al.*, 1990); mientras que desde el punto de vista histopatológico en el tracto respiratorio se observan cambios consistentes en bronquiolitis y alveolitis (Storz *et al.*, 2000b).

El rotavirus bovino produce necrosis de las vellosidades destruyendo los enterocitos del intestino delgado resultando en una mala absorción y diarrea acompañada de una profusa eliminación fecal del virus (Mebus *et al.*, 1971).

Es importante diferenciar las lesiones de las producidas por otros agentes etiológicos como serían las producidas por *Cryptosporidium parvum* ya que este se multiplica en las vellosidades intestinales causando necrosis, fusión de las mismas y malabsorción; los Torovirus infectan los enterocitos de las vellosidades y de las criptas del yeyuno, ileón, colon y ciego, induciendo atrofia de las vellosidades y necrosis de las criptas en becerros (Kuwabara *et al.*, 2007).

La cepa de *Escherichia coli* enterotoxigénica coloniza el intestino gracias a los pilis de la bacteria que se adhieren al intestino delgado. El Pili K99 está asociado con la producción de una toxina estable, la cual produce diarrea hipersecretora (Millis y Tietze, 1984).

La salmonela se manifiesta con diarrea aguda (Santos *et al.*, 2002). La clostridiasis se manifiesta con gastroenteritis hemorrágicas, se ha encontrado abomasitis ulcerativa y enfisematosas en becerras .

Diagnóstico

El diagnóstico basado en la serología es de gran utilidad, debido a que los anticuerpos generados por los individuos en respuesta a la infección aparecen en estadios tempranos de la enfermedad; en este sentido Mebus (1990) planteó que en individuos inoculados experimentalmente con coronavirus la respuesta de anticuerpos neutralizantes aparece entre 7 a 8 días después de la exposición. El diagnóstico de laboratorio de estas infecciones virales se establece mediante la demostración del virus en las heces recolectadas de

animales enfermos y en el aumento del título de anticuerpos, siendo necesario reseñar, que debido a la alta seroprevalencia en ausencia de enfermedad de estas infecciones, una determinación serológica puntual no tiene valor diagnóstico. Es preciso la demostración del virus en heces, y ésta se consigue mediante técnicas que van desde la microscopía electrónica, pruebas de aglutinación en látex o ELISA. Desde hace un tiempo, es posible el diagnóstico y genotipificación de estos virus mediante técnicas de Biología Molecular como es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), siendo éste el método de detección más sensible. Para asegurarse del diagnóstico es necesario identificar el rotavirus en un número significativo de animales con diarrea en comparación con terneros sanos del mismo grupo de edad (Mebus, 1990).

Control y vacunación

Como parte de las medidas contraepizooticas de prevención se debe contemplar las de carácter zootécnico, que implican un adecuado régimen nutritivo de acuerdo a la categoría, raza, edad, etc., fundamentalmente en terneros, donde el consumo de calostro es de vital importancia, debido a la presencia de anticuerpos que pueden generar una protección, además se debe impedir cualquier circunstancia que provoque situaciones de estrés (Martínez *et al.*, 2002).

En los territorios no afectados de países afectados, las medidas deben estar encaminadas fundamentalmente a evitar la introducción de animales provenientes de áreas afectadas (Martínez *et al.*, 2002), dependiendo la prevención, de los procedimientos de aislamiento de los animales y de desinfección durante las epizootias y de la aplicación de programas de vacunación (Espinasse *et al.*, 1990).

En los países afectados se han desarrollado diferentes tipos de vacunas para la protección de los rebaños no afectados clínicamente de la enfermedad, así, se han elaborado y comercializado para la aplicación tanto a terneros como a individuos adultos, lo que garantiza una adecuada protección (Takamura *et al.*, 2002).

En este sentido se ha comprobado que la administración oral de coronavirus atenuado en terneros permite una resistencia al desafío postinoculación 96 horas después. Investigaciones realizadas por Mebus (1990), han demostrado que a partir de 6 a 7 días postinoculación, los anticuerpos neutralizantes como las inmunoglobulinas (Ig) M y A aparecen en el lavado del lumen intestinal con altos títulos a los 10 días postinoculación, los cuales persisten, mientras que los anticuerpos circulantes aparecen de 7 a 8 días postinoculación. Por lo tanto, la resistencia a la infección por coronavirus es primordialmente por la presencia de anticuerpos en calostro y/o en leche o por la producción activa de IgM e IgA en el lumen intestinal (Carman,1990).

En cuanto a las medidas contraepizoóticas de recuperación el primer paso a dar en los brotes de la enfermedad es la cuarentena del área afectada para impedir su propagación hacia las áreas no afectadas. En el foco de la enfermedad se debe proceder al aislamiento de los animales clínicamente afectados de los sanos. La mayoría de los animales afectados se recuperan espontáneamente entre 7 a 14 días sin tratamientos específicos quedando portadores que eliminan el virus por periodos prolongados, los que constituyen una fuente potencial para futuras infecciones (Martínez *et al.*, 2002).

La vacunación oral en terneros induce una inmunidad activa, sin embargo el problema con la vacunación oral es que esta interfiere en relación con la ingestión de calostro y los anticuerpos en el calostro. La interferencia entre anticuerpos calostrales y vacunas atenuadas puede ser superada por la vacunación de terneros en el útero. Los virus atenuados inoculado en el fluido amniótico de 7 a 8 meses en el feto no causa efectos adversos y se observa circulación de anticuerpos (Mebus, 1990).

La vacunación de vacas antes del parto genera un incremento de anticuerpos en calostro y leche y reduce la incidencia y/o la severidad de los signos clínicos en las crías (Rodak *et al.*, 1982).

En este sentido Takamura *et al.*, (2002) elaboraron una vacuna obtenida en cultivo de tejido inactivada con Triton X-100 y adyuvada en aceite, obteniendo excelentes resultados en cuanto a los niveles de inmunidad generados en vacas y su transmisión a las crías.

En general la inmunidad generada después de la exposición al virus puede ser protectora de 6 meses hasta 2 a 3 años (Espinasse *et al.*, 1990), con títulos entre 64 a 256 por seroneutralización y alrededor de 256 a 512 por inhibición de la hemoaglutinación (Lin *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2002).

Actualmente la vacuna con virus inactivado de rotavirus y coronavirus, con la bacterina de *Escherichia coli* conteniendo los factores de adherencia K-99 (F5). Toxoide de *Clostridium perfringens* tipo C. Adyuvante y gentamicina como conservador (Eiden *et al.*, 1994).

Al aplicar este tipo de vacunas existen ciertos beneficios para el hato como son: Proporcionar la protección más temprana que pueda recibir la cría. Se vacuna a la madre para que proteja al becerro desde el nacimiento a través de los anticuerpos en calostro (Dringeliene *et al.*, 2004). Protege al becerro contra las enfermedades más comunes de su edad (Cho *et al.*, 2004). Aumenta la producción, ya que disminuye la cantidad de animales retrasados en crecimiento o que mueren por estas enfermedades (Enjuanes *et al.*, 2003). Básicamente se realiza la vacunación de vacas gestantes sanas como un auxiliar en la inmunización pasiva de sus becerros contra las diarreas producidas por Rotavirus y Coronavirus, cepas enterotoxigénicas de *E. coli* con el factor de adherencia K-99 (F5) y la enterotoxina de *Clostridium perfringens* tipo C. (Lamphear *et al.*, 2002).

OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de Rotavirus y Coronavirus involucrados en la diarrea indiferenciada de las becerras con diarrea en la cuenca lechera de Delicias, Chihuahua.

OBJETIVO ESPECIFICO

Analizar muestras de heces de becerras con diarrea para realizar el diagnóstico de Rotavirus y Coronavirus por la técnica de ELISA, utilizando un paquete comercial.

HIPOTESIS

En la cuenca lechera de Delicias, Chihuahua las becerras en crianza presentan infecciones diarreicas producidas por Rotavirus y Coronavirus.

JUSTIFICACIÓN

El municipio de Delicias, Chihuahua basa su economía fundamentalmente en la agricultura y la producción de leche, y es reconocida como una cuenca lechera en crecimiento en el país, en virtud de su modernidad. Es por eso que la identificación de los agentes patógenos capaces de mermar la producción, es de primordial importancia ya que afectan al futuro productivo de hato. Tomando en cuenta estos antecedentes, y considerando que no existen estudios sobre infecciones diarreicas en becerras en esta cuenca lechera, se realiza la presente investigación para identificar la presencia de Rotavirus y Coronavirus en becerras con diarrea.

MATERIALES Y METODOS

Se tomaron 21 muestras de heces de becerras con diarrea directamente del recto, de 7 establos lecheros, con la finalidad de identificar antígeno de Rotavirus y Coronavirus, se depositaron en bolsas de plástico estériles y se transportaron en refrigeración al laboratorio para procesarlas, utilizando un método de análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), disponible comercialmente, y se analizaron de acuerdo a las especificaciones de la prueba.

Especificaciones de la prueba

Principio de la prueba.

Las muestras son capturadas en placas de microtitulación de 8 x 12 pocillos, cubiertas con anticuerpos específicos producidos contra patógenos virales responsables de enfermedades digestivas.

Estos anticuerpos específicos permiten la captura de los patógenos de rotavirus y coronavirus que pudieran estar en las heces diarreicas.

Los pocillos de las filas A, C, E, G están sensibilizados con estos anticuerpos y las filas B, D, F, H no contienen anticuerpos específicos. Esto permite la diferenciación entre determinadas reacciones inmunológicas y la unión no específica a fin de eliminar los falsos positivos.

Procedimiento:

1. El paquete de diagnóstico se coloca a temperatura ambiente al menos media hora antes de su uso.
2. Se diluye una solución de lavado (solución amortiguadora) en concentración de 1:20 con agua destilada, asegurándose de que desaparezcan todos los cristales y se mantiene a 4 °C cuando no se utiliza.

3. Se diluyen las muestras fecales por partes iguales con la solución amortiguadora. Se desechan las partículas grandes después de la decantación natural por 10 minutos. No se centrifugan las suspensiones.

4. Se añaden equitativamente 100 microlitros de las muestras diluidas a los pocillos utilizando controles positivos y negativos.

5. Se incuba la placa a temperatura ambiente durante 1 hora.

6. Pasado el tiempo se enjuaga la placa con la solución de lavado preparado, vaciando el contenido de la microplaca. Se coloca la microplaca boca abajo contra una pieza limpia de papel absorbente para eliminar todo el líquido sobrante, sin dejar que se sequen los pocillos. Se rellenan todos los pocillos utilizados, con la solución de lavado, a continuación se vacían los pocillos una vez más, girando el plato para verterlo. Se repite la operación dos veces más, teniendo cuidado para evitar la formación de burbujas en las microcubetas. Después de que la placa ha sido lavada tres veces se debe continuar con el próximo paso.

7. Se diluye el conjugado en proporción 1:20 con la solución buffer de dilución. Se añaden 100 microlitros del conjugado a cada pocillo. Se incuba a temperatura ambiente durante 60 minutos.

8. Se lava la placa tal como se describe en el paso 6.

9.- Se prepara la solución indicadora añadiendo 500 microlitros de cromógeno a 9.5 mL de la solución sustrato. Se mezcla bien, de inmediato se vierten 100 microlitros a cada pocillo.

10. Se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente.

11. Se añaden 50 microlitros de solución paradora por pocillo.

12. Se leen las densidades ópticas utilizando un lector de placas con un filtro de 450 nm.

Interpretación de resultados:

Se calcula la densidad óptica de cada muestra restando de la lectura de cada muestra y la densidad óptica del control negativo correspondiente. Se realiza la misma acción para el control positivo.

RESULTADOS

Las muestras de heces colectadas correspondieron a 12 becerras y 9 becerros, de 1 a 35 días de edad con un promedio de 13 días. Los 7 (100%) establos estudiados presentaron problemas infecciosos gastrointestinales manifestados con diarrea.

Las heces presentaron una coloración desde amarillenta clara hasta color café claro, y heces verdes (por la pigmentación del sustituto de leche), y algunas con estrías de sangre.

Se obtuvo un 57.14% (12/21) de heces positivas a la presencia de antígeno de rotavirus y 14.28% (3/21) para coronavirus.

Las infecciones mixtas se presentaron con más frecuencia que las infecciones por un solo agente, siendo estas en un 42.85% (9/21). Las infecciones únicas fueron para Rotavirus de 23.80% (5/21), Coronavirus 4.76% (1/21).

Figura 1. Frecuencia de Rotavirus y Coronavirus en becerros Holstein de la cuenca lechera de Delicias, Chihuahua.

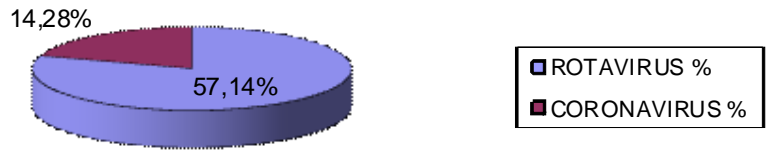
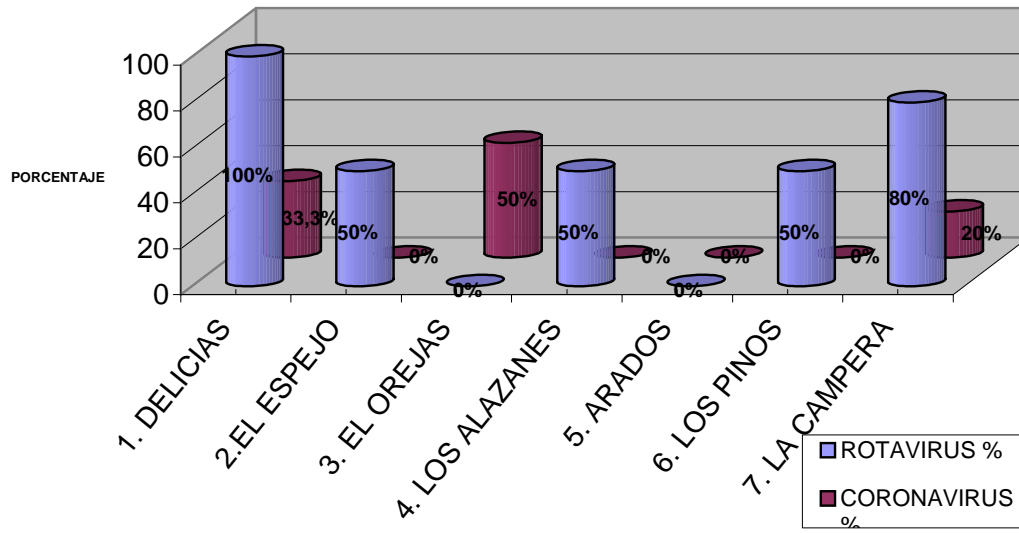


Figura 2. Frecuencia de Rotavirus y Coronavirus por establos, en becerros Holstein de la cuenca lechera de Delicias, Chihuahua.



DISCUSIÓN

El estudio realizado en la cuenca lechera de Delicias, Chihuahua muestra riesgo de infección por Rotavirus seguido de Coronavirus, tomando en cuenta el porcentaje de animales positivos con respecto al total y considerando el número de establos con presencia de estos patógenos, la prevalencia de infección mixta es alta.

Alternativo a este trabajo se procesaron muestras de 81 becerros y 9 vacas, de 1 a 35 días de edad con un promedio de 13 días de vida de 9 establos de la Comarca Lagunera utilizando también la técnica de ELISA se muestran valores similares para Rotavirus de 46.7% (42/90) con rangos de 33.3% a 60% y Coronavirus 27.8% (25/90) y rangos de 10% a 70%.

Las infecciones mixtas se presentaron con más frecuencia que las ocasionadas por un solo agente, siendo estas 54.4% (49/90), para Rotavirus y Coronavirus 3.3% (3/90).

Cuadro 1. Estudio comparativo de infecciones digestivas en becerros de Delicias, Chihuahua y la Comarca Lagunera.

Agente etiológico	1.1.1 Delicias, Chihuahua	Comarca Lagunera
Rotavirus	57.14%	46.70%
Coronavirus	14.28%	27.80%

En un estudio patológico retrospectivo de 1995 a 1999 en la Comarca Lagunera se reportaron lesiones características de enteritis necróticas compatibles con lesiones causadas por rotavirus y coronavirus, en un 49% de intestinos observados histológicamente (Delgado 2000).

Estos resultados nos indican que a pesar de tener una vacunación contra estos virus, los agentes se siguen manifestando con la misma intensidad. Sin embargo las enteritis catarrales observadas en este estudio (30%) fueron diagnosticadas como sugestivas a E.coli, la cual se manifestó disminuida en esta investigación (14.9%).

Posteriormente la técnica de ELISA se ha modificado agregando otros antígenos que permitan el diagnóstico de la diarrea indiferenciada de las becerras.

Para ello actualmente se utilizan una mezcla de cuatro anticuerpos monoclonales específicos para detectar antígenos de Rotavirus, Coronavirus, Cryptosporidium parvum y E.coli K99 (Thorns *et al.*, 1992).

El control del síndrome de la diarrea indiferenciada de las becerras va encaminado hacia el manejo de la inmunidad de las madres, por medio de la vacunación contra Rotavirus y Coronavirus durante el secado y el reto. Sin embargo debe tomarse en cuenta que un mal manejo del calostro impide la inmunización adecuada del becerro, por lo tanto el manejo del calostro es de suma importancia para transferir la inmunidad deseada (Delgado *et al.*, 2008).

El calostro debe ser ordeñado bajo estrictas normas de higiene evitando de esta manera la contaminación de los recipientes donde se va a depositar, controlando el ambiente y la desinfección de manos del personal encargado de la recolección de este. La medición de la calidad del calostro también requiere medidas higiénicas y separar el calostro de acuerdo calidad y congelarlo inmediatamente en recipientes de tamaños uniformes, si es que no se va a utilizar de inmediato. La cantidad de calostro administrada (2 litros de primera calidad) deberá ser en la primera media hora de nacido el animal. Al momento de administrar el calostro es necesario mantenerlo a temperatura ambiente; con esto se cumple el manejo de calostro que debe tener temperatura, calidad, cantidad y tiempo de administración adecuados (Delgado *et al.*, 2008).

Además del manejo del calostro, la inmunidad se puede verificar dentro de las primeras 24 a 48 horas utilizando la refractometría del suero sanguíneo (valor óptimo arriba de 6.0), ésta deberá practicarse máximo tres horas después de que los becerros hayan ingerido leche, calostro o agua, para evitar falsos valores debido a la deshidratación de los animales.

En caso de presentarse diarreas en los becerros se deberá tomar una historia clínica completa, además es recomendable que inmediatamente se envíen muestras de heces al laboratorio para el diagnóstico de Rotavirus, Coronavirus. *E coli* y *Cryptosporidium parvum* por la técnica de ELISA, solicitar frotis para la identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp por medio de la tinción de Ziehl Neelsen modificada, cultivo bacteriológico en Caldo Tetracionato y posteriormente en Agar Salmonella Shigella, para la detección de esas bacterias.

Si ha muerto algún animal es necesario practicar la necropsia, describir detalladamente los hallazgos y tomar muestras de diferentes partes del tracto digestivo que incluyan el rumen, omaso, abomaso, duodeno, yeyuno, ileon, válvula ileocecal, ciego, colon y recto, además de páncreas e hígado u otros órganos que presenten lesiones y fijarlos en formol al 10% en una relación de 1 parte de tejido por 10 partes de formol.

LITERATURA CITADA

1. Ahmed, M. U., Kobayashi, N., Wakuda, M. & 9 other authors (2004). Genetic analysis of group B human rotaviruses detected in Bangladesh in 2000 and 2001. *J Med Virol* 72, 149–155.
2. Bridger, J. C. (1994). Non-group A rotaviruses. In *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*, 2nd edn, pp. 369–407. Edited by A. Z. Kapikian. New York: Marcel Dekker.
3. Bridger, J. C. & Brown, J. F. (1985). Prevalence of antibody to typical and atypical rotaviruses in pigs. *Vet Rec* 116, 50.
4. Brown, D. W. G., Beards, G. M., Chen, G.-M. & Flewett, T. H. (1987). Prevalence of antibody to group B (atypical) rotavirus in humans and animals. *J Clin Microbiol* 25, 316–319.
5. Beer, J. (1983). Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. Infecciones por coronavirus. Infecciones de los bovinos por coronavirus. Editorial Acribia. 231 232.
6. Bohl, E.H. , K. W.Theil, and L.J.Saif, (1984): Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotaviruses. *J.Clin.Microbiol.* 19, 105–111.
7. Brandao, P.E., Gregori, F., Heinemann, M.B., Lima, C.H.A., Rosales, C. A.R., Ruiz, V.L.A. y Jerez, J.A. 2001. Animal coronavirus. *Virus Rev. And Res.* 1 (6): 7 13.
8. Brandao, P.E., Gregori, F., Monteleone, G.S., Soares, R.M., Rosales, C. A.R. y Jerez, J. A. (2003). Nested PCR assay for detection of bovine coronavirus S1 gene. *Arq. Inst. Biol.* 70 (1): 1-3.
9. Bridger, J. C. (1994). Non-group A rotaviruses. In *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*, 2nd edn, pp. 369–407. Edited by A. Z. Kapikian. New York: Marcel Dekker.
10. Bridger, J. C. & Brown, J. F. (1985). Prevalence of antibody to typical and atypical rotaviruses in pigs. *Vet Rec* 116, 50.
11. Bridger, J. C., Clarke, I. N. & McCrae, M. A. (1982). Characterization of an antigenically distinct porcine rotavirus. *Infect Immun* 35, 1058–1062.
12. Carman, P.S. y Hazlett, M.J. (1992). Bovine coronavirus infection in Ontario, 1990-1991. *Can. Vet. J.* 33: 812-814.

12. Ciarlet, M., M. Hidalgo, M. Gorziglia, and F. Liprandi, (1994): Characterization of neutralization epitopes on VP7 of serotype G11 porcine rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 75, 1867–1873.
- Clark, M.A. 1993. Bovine coronavirus. *Br. Vet. J.* 149: 51-70.
13. Chang, K. O., Parwani, A. V., Smith, D. & Saif, L. J. (1997). Detection of group B rotaviruses in fecal samples from diarrheic calves and adult cows and characterization of their VP7 genes. *J Clin Microbiol* 35, 2107–2110.
14. Cho, K.O., Hoet, S.C., Loerch, T., Wittum, E. y Saif, L. J. (2004). "Evaluation of Concurrent Shedding of Bovine Coronavirus Via the Respiratory and Enteric Route in Feedlot Cattle," *Am. J. Vet. Res.* 62: 1436–41.
15. Cho, K.O., Hasoksuz, M., Nielsen, P.R., Chang, K.O., Lathrop, S. y Saif, L. (2001). Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. *Arch. Virol.* 146: 2401-2419.
16. Cho, K.O., Nielsen, P.R., Chang, K.O., Lathrop, S. y Saif, L.J. (2003). "Cross- Protection Studies of Respiratory, Calf Diarrhea and Winter Dysentery Coronavirus Strains in Calves and RT-PCR and Nested PCR for Their Detection," *Archives of Virology* 146: 2401–2419.
17. Czerny, C.P y Eichhorn, W. (1989). Characterization of monoclonal and polyclonal antibodies to bovine coronavirus: establishment of an efficient ELISA for antigen detection in feces. *Vet microbial.* 20(2):111-122.
18. Dea, S., Michaud, L. y Milane, G. (1995). Comparison of bovine coronavirus isolates associated with neonatal calf diarrhea and winter dysentery in adult dairy cattle in Quebec. *Gen. Virol.* 76: 1263-1270.
19. Delgado, G.R (2000). Diarrea de las terneras en bovinos holstein de la comarca lagunera. *Memorias del IX congreso nacional de la sociedad mexicana de patólogos veterinarios, A.C. Gómez Palacio, Dgo. Pag.44-45.*
20. Delgado, G.R, Leyva O.C, Santizo, R.W, Morales G.O, García, P.A, Ortiz, D,D, Solano, G.R, Contreras P.J, Palacios, J.M (2008). Etiología de la diarrea indifrenciada en becerras Holstein de la Comarca Lagunera.

21. Dong X.Y., Yang X.A., Li Y., Xu G.B., Feng Z.R., Wang Y.D. y Chen W.F. (2004). The cloning, expression, purification and identification of SARS virus S2 gene and study on its immunological characteristics. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 20: 257-260.
22. Dringeliene, A., Markevicius, A. y Aeaite, J. (2004). Cellular immunity of coronavirus-infected bovine from different districts of Lithuania. *Ekologija*. 4: 1-5.
23. Eiden, J., Vonderfecht, S., Theil, K., Torres-Medina, A. & Yolken, R. H. (1986). Genetic and antigenic relatedness of human and animal strains of antigenically distinct rotaviruses. *J Infect Dis* 154, 972–982.
24. Eiden, J. J., Nataro, J., Vonderfecht, S. & Petric, M. (1992). Molecular cloning, sequence analysis, in vitro expression, and immunoprecipitation of the major inner capsid protein of the IDIR strain of group B rotavirus (GBR). *Virology* 188, 580–589.
25. Eiden, J. J., Mouzinho, A., Lindsay, D. A., Glass, R. I., Fang, Z.-Y. & Taylor, J. L. (1994). Serum antibody response to recombinant major inner capsid protein following human infection with group B rotavirus. *J Clin Microbiol* 32, 1599–1603
26. Enjuanes, L., Almazán, F., y Ortego, J. (2003). Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells. Virus-based vectors for gene expression in mammalian cells: Coronavirus. Chapter 3.8. Ed. S.C. Makrides.
27. Espinasse, J., Savey, M. y Viso, M. (1990). Virus infections of vertebrates. Virus infections of ruminants. Winter Dysentery of adult Cattle Virus. Elsevier Science Publishers. Chapter 28: 301-306.
28. Estes, M.K., and J. Cohen, (1989): Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 53, 410–449.
29. Falcone E., Tarantino M., L. Di Trani, Cordioli P., Lavazza A., y Tollis M, (1999). Determination of Bovine Rotavirus G and P Serotypes in Italy by PCR. *Journal of clinical microbiology*, 37:3879-3882.
30. González, J.M., Gómez-Puertas, P., Cavanagh, D., Gorbaleya, A.E. y Enjuanes, L.A. (2003). A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. *Arch. Virol.* 148 (11): 2207-2235.

31. Gouvea V., Santos N., and Timenetsky M., (1994). Identification of Bovine and Porcine Rotavirus G Types by PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 32(5): 1338-1340.
32. Gorwes, D.J. (1982). Virus infections of the gastrointestinal tract. Coronavirus in animals. Bovine coronavirus enteritis. Marcel Dekker, INC. 334-341.
33. Hasoksuz M, Sreevatsan S, Cho KO, Hoet AE y Saif LJ. 2002. Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates. *Virus Res.* 84: 101-109.
34. Hasoksuz, M., Kayar, A., Dodurka, T., Ilgaz, A. (2005). Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in Northwestern Turkey. *Acta Veterinaria Hungarica.* 53 (1): 137-146.
35. Heckert, R.A., Saif, L.J., Mengel, J.P. y Myers, G.W. (1991). Mucosal and systemic antibody responses to bovine coronavirus structural proteins in experimentally challenge - exposed calves fed low or high amounts of colostrum antibodies. *Am. J. Vet. Res.* 52: 700-708.
36. Jactel, B., Espinasse, J., Viso, M. y Valiergue, H. (1990). An epidemiology study of winter dysentery in fifteen herds in France. *Vet. Res. Commun.* 14 (5): 367-379.
37. Jaynes, C., Tyler, H., Quigley, J., Kapil, S. y Arthington, J. (2004). The use of bovine serum protein as an oral support therapy following coronavirus challenge in calves. Iowa State University Animal Industry Report. A. S. Leaflet. R1910.
38. Jeong JH, Kim GY, Yoon SS, Park SJ, Kim YJ, Sung CM, Shin SS, Lee BJ, Kang MI, Park NY, Koh HB y Cho KO. (2005b). Molecular analysis of S gene of spike glycoprotein of winter dysentery bovine coronavirus circulated in Korea during 2002-2003. *Virus Res.* 108: 207-212.
39. Jerez, J.A., Brandao, P.E., Buzinaro, M.G., Gregori, F., Rosales, C.A.R., Ito, F. y Sakai, T. (2002). Detecção de rotavírus e coronavírus em fezes de bezerros neonatos com diarreia criados em varios municípios do Estado de Sao Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Boil.* 69: 19-23.
40. Kapikian, A. Z. *Viral infections of the gastrointestinal tract.* (1994). 2. ed. New York: Marcel-Dekker, p 780.

41. Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B y Straus, S.E. (2001). Fundamental Virology. Part II. Specific Virus Families Coronaviridae: The Viruses and Their Replication. Fourth Edition. 641-664.
42. Kuwabara, M., Wada, K., Maeda, Y., Miyazaki, A. Y Tsunemitsu, H. (2007). First isolation of Cytopathogenic bovine coronavirus in cell culture from a calf with diarrhea. Clin. Vaccine Immunol. 14:998-1004.
43. Lamphear BJ, Streatfield SJ, Jilka JM, Brooks CA, Barker DK, Turner DD, Delaney DE, Garcia M, Wiggins B, Woodard SL, Hood EE, Tizard IR, Lawhorn B y Howard JA. (2002). Delivery of subunit vaccines in maize seed. J Control Release. 13:169-180.
44. Langpap, T.J., Bergeland, M.E. y Reed, D.E. (1979). Coronaviral enteritis of young calves: virologic and pathologic findings in naturally occurring infections. Am. J. Vet. Res. 40:1476-1478.
45. Lin, X.Q., O'Reilly, K.L. y Storz, J. (2002). Antibody Responses of Cattle with Respiratory Coronavirus Infections during Pathogenesis of Shipping Fever Pneumonia Are Lower with Antigens of Enteric Strains than with Those of a Respiratory Strain. Clinical. Diagn Labo. Immunol. 9: 1010-1013.
46. Lin, X.Q., O'Reilly, K.L., Storz, J., Purdy, C.W. y Loan, R.W. (2000). Antibody responses to respiratory coronavirus infections of cattle during shipping fever pathogenesis. Arch. Virol. 145: 2335-2349.
47. Liu, L. (2002). Expression of the Bovine coronavirus proteins by recombinant Adenovirus Vectors. Department of Virology, National Institute and Department of Veterinary Microbiology, Swedish University og Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. Disponible en: <http://xray.bmc.uu.se/Concurses/PT/Project/Project2002/LihongAdenovirusfinal2.htm>
48. Losinger, W.C., Heinrichs, A.J (1997). Factores asociados con alta mortalidad por diarrea en terneras antes del desdete. Archivos de zootecnia, 46 (176):311-322.
49. Martínez, A., Caballero, M., Silva, S. y Jiménez, C. (2002). Aislamiento y caracterización de coronavirus bovino asociado a un brote de diarrea epizootica (Disentería Bovina) en bovinos adultos en Costa Rica. III

Seminario Internacional de Sanidad Animal y I Seminario de Producción Animal. ESPE, Sangolquí 12-15/11/2002.

50. Mc. Arthur, Deborah. (1997). Bovine Coronavirus Infection: Clinical Syndromes in adult Cattle and Calves. Disponible en: <http://www.addl.purdue.edu/newsletters/1997/spring/bci.shtml>
51. Mebus, C.A. (1990). Virus infections of vertebrates. Virus infections ruminants. Neonatal calf diarrhea. Elsevier Science Publishers. Chapter 27: 297-300.
52. Mebus, C.A., Newman, L.E. y Stair, E.L. (1975). Scanning electron, light, and immunofluorescent microscopy of intestine of notobiotic calf infection with calf diarrhea coronavirus. Am. J. Vet. Res. 36: 1719-1725.
53. Mebus, C.A., Stair, E.L., Rhodes, M.B. y Twiehaus, M.J. (1973a). Neonatal calf diarrhea: Propagation, attenuation, and characterization of a coronavirus-like agent. Am. J. Vet. Res. 34: 145-150.
54. Mebus, C.A., Stair, E.L., Rhodes, M.B. y Twiehaus, M. J. (1973b). Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a coronavirus-like agent. Vet. Pathol. 10: 45-64.
55. Mebus, C.A., Withe, R.G., Stair, E.L., Rhodes, M.B. y Twiehaus, M.J. (1972). Neonatal calf diarrhea: Results of a field trial using a Reo-like virus vaccine. Vet. Med. Small Animal Clinician. 67: 173-178.
56. Millane, G., Michaud, L. y Dea, S. (1995). Biological and molecular differentiation between coronaviruses associated with neonatal calf diarrhea and winter dysentery in adult cattle. Adv. Exp. Med. Boil. 380: 29-33.
57. Mills, K.W y Tetze, K.L (1984). Monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay for identification of K99-positive Escherichia coli isolates from calves. J. Clin. Microbiol. 19:498-501.
58. Nagesha, H.S. , and I.H.Holmes, (1988): New porcine rotavirus serotype antigenically related to human rotavirus serotype 3. J.Clin. Microbiol. 26, 171–174.
59. Paul, P.S., and G.W. Stevenson, (1992): Porcine rotavirus infection: Diseases of swine, 7th edition. Leman et al. (ed.), Iowa State University Press, Ames, IA, pp 331–348.

60. Pongsuwanna, Y., K. Taniguchi, M. Chiwakul, T. Urasawa, F. Wakasugi, C. Jayavasu and S. Urasawa, (1996): Serological and genomic characterization of porcine rotaviruses in Thailand: detection of a G10 porcine rotavirus. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1050–1057.
- Rach, M.L., S.S. Kroeff, V. Munford, T.A. R. Caruzo, E.L. Durigon, Y. Hayashi, V. Gouvea, and E.A. Palombo, 2000: Molecular characterization of porcine rotaviruses from the southern region of Brazil: characterization of an atypical genotype G[9] strain. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2443–2446.
61. Rest, J. y Mindell, D. (2003). SARS associated coronavirus has a recombinant polymerase and coronavirus have history of host-shifting. *Infect. Genet. Evolut.*, 3, 219-225.
62. Rodak, L., Babiuk, L.A., Acres y S.D. (1982). Detection by radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay of coronavirus antibodies in bovine serum and lacteal secretions. *J Clin Microbiol.* 16, 1: 34–40.
63. Saif, L.J. (2004). Animal coronaviruses: what can they teach us about the severe acute respiratory syndrome. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 23, (2): 643:660.
64. Saif, L.J., Redman, D.R., Moorhead, P.D. y Theil, K.W. (1994). Experimentally induce coronavirus infections in calves: viral replication in the respiratory and intestinal tracts. *Am. J. Vet. Res.* 47: 1426-1432.
65. Saif, L.J. (2002). "Coronaviruses: Update on Diagnosis, Pathogenesis and Control of Bovine Coronavirus-Associated Calf Diarrhea, Winter Dysentery and Shipping Fever." In Proceedings of the Iowa Veterinary Medical Association Meeting, Iowa State University, College of Veterinary Medicine, Ames, IA, September 12, 2002.
66. Santos, R.L., Zhang, S., Tsolis, R.M., Baumler, A.J y Adams, L.G (2002). Morphologic and molecular characterization of salmonella typhimurium infection in neonatal calves. *Vet Pathol.* 39:200.
67. Storz, J., Lin X.Q., Purdy, C.W., Chouljenko, V.N., Kousoulas, K.G., Enright, F.M., Gilmore, W.C. y Loan, R.W. (2000a). Coronavirus and Pasteurella infections in bovine shipping fever pneumonia and Evans' criteria for causation. *J. Clin. Microbiol.* 38 (9): 3291-3298.

68. Storz, J., Purdy, C.W., Lin, X.Q., Burrell, M., Truax, R.E., Briggs, R.E., Frank, G.H. y Loan, R.W. (2000b). Isolation of respiratory bovine coronavirus, other cytotidal viruses, and Pasteurella spp. from cattle involved in two natural outbreaks of shipping fever. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 216: 1599-1604.
69. Storz, J., Stine, A., Liem, C. y Anderson, G.A. (1996). Coronavirus isolation from nasal swab samples in cattle with signs of respiratory tract disease after shipping. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208: 1452-1455.
70. Takamura, K., Matsumoto, Y. y Shimizu, Y. (2002). Field study of bovine coronavirus vaccine enriched with hemagglutinating antigen for winter dysentery in dairy cows. *Can. J. Vet. Res.* 66: 278-281.
71. Tsunemitsu, H., Smith, D. R. y Saif, L. J. (1999). Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus en feces by RT-PCR. *Arch. Virol.* 144: 167-175.
72. Van Kuiningen, R.J., Hill, S.L., Tilton, R.C. y Ryan, R.W. (1995). Winter dysentery in dairy cattle: recent findings. *Comp. Cont. Ed.* 7: 591-599.
73. Woode, G. N., (1986): Porcine rotavirus infection. In: Leman (ed.), *Diseases of Swine*, 6th edn, pp.368–382. Iowa State University Press, Ames, IA.