

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DIAGNÓSTICO INMUNOHISTOQUÍMICO DE ENTEROPATÍAS
CAUSADAS POR CORONAVIRUS Y ROTAVIRUS EN BECERRAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ALFREDO PÉREZ GUIOT

ASESORES:

MVZ MC CARLOS GERARDO SALAS GARRIDO

M en MVZ MARIO ADÁN BEDOLLA ALVA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres, Patricia Guiot Ramírez y Alfredo Pérez Mendoza, que siempre se han esforzado por brindarnos salud, por estar en los momentos cruciales de mi formación académica y personal; pero sobre todo por ser los pilares de mi vida.

A mi hermana, Marina Pérez Guiot que siempre ha estado ahí para mí.

A Dana, mi inspiración.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, MVZ MC Carlos Gerardo Salas Garrido y MMVZ Mario Adán Bedolla Álva, quienes siempre estuvieron ahí para apoyarme, brindarme su confianza y consejos para la realización de este proyecto.

A Mireya por ser mi tercer asesor y consejera para esta tesis; y brindarme su amistad y gran apoyo siempre.

A mis compañeros y amigos, Diego, Óscar, Mayra, Marco y Yanet, por siempre estar ahí para escucharme y transmitirme sus conocimientos.

A mis compañeros de internado, Luis Mario, Luz María y Brenda por las experiencias compartidas.

A mis amigos de la FMVZ, Liz, Rodrigo, Rolón, Tlachi, Yahel por el apoyo incondicional durante la carrera.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
• Síndrome Diarreico Neonatal.....	2
• ROTAVIRUS.....	4
• Morfología.....	5
• Patogenia.....	5
• CORONAVIRUS.....	7
• Morfología.....	8
• Patogenia.....	8
• Diagnóstico.....	10
• Tratamiento de la diarrea.....	12
• Prevención y control.....	13
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
MATERIAL Y MÉTODOS	17

• Muestras biológicas.....	17
• Procesamiento de las muestras.....	17
• Evaluación histopatológica.....	18
• Evaluación inmunohistoquímica.....	22
• Relación de la evaluación histopatológica con la inmunohistoquímica.....	23
RESULTADOS	25
• Estudio histopatológico.....	25
○ Morfología de los enterocitos de las vellosidades.....	25
○ Degeneración de los enterocitos de las vellosidades...	25
○ Necrosis de los enterocitos de las vellosidades.....	26
○ Hiperplasia de células caliciformes.....	26
○ Descamación de enterocitos de las vellosidades.....	26
○ Morfología de los enterocitos de las criptas.....	27
○ Degeneración de los enterocitos de las criptas.....	27
○ Necrosis de los enterocitos de las criptas.....	28
○ Hiperplasia de los enterocitos de las criptas.....	28
○ Criptitis.....	29
○ Descamación de enterocitos de las criptas.....	29

○ Atrofia de vellosidades.....	29
○ Fusión de vellosidades.....	30
○ Enteritis.....	30
○ Edema.....	30
○ Bacterias.....	31
○ Otro (<i>Cryptosporidium spp.</i>).....	31
○ Linfonecrosis.....	31
○ Atrofia linfoide.....	31
○ Lesiones representativas.....	32
• Inmunohistoquímica.....	33
○ Coronavirus.....	33
○ Rotavirus.....	34
• Relación entre el grado de lesión con la positividad mostrada en IHQ.....	36
DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIONES.....	42
REFERENCIAS.....	44
FIGURAS.....	51
CUADROS.....	73

RESUMEN

PÉREZ GUIOT, ALFREDO. Diagnóstico inmunohistoquímico de enteropatías causadas por coronavirus y rotavirus en becerras (bajo la dirección de MVZ MC Carlos Gerardo Salas Garrido y del MMVZ Mario Adán Bedolla Álva).

Se realizó un estudio retrospectivo de 2008-2012; donde se analizaron 50 muestras de intestino de becerras entre 1 a 3 semanas de edad; las cuales presentaron cuadros clínicos diarreicos, así como lesiones macroscópicas y/o microscópicas sugerentes a enteritis virales. El tejido intestinal fue evaluado por histopatología e inmunohistoquímica para antígenos de rotavirus y/o coronavirus. Las lesiones histológicas más representativas (>60%) fueron: Cambios en la morfología de los enterocitos de las vellosidades, descamación de enterocitos, cambios en la morfología de los enterocitos de las criptas y atrofia de vellosidades. Se obtuvieron 50 casos (100%) con inmunopositividad para coronavirus y 47 casos (94%) para rotavirus. Además, se estableció un método para correlacionar entre el grado de lesiones microscópicas y la positividad por inmunohistoquímica, donde se encontró que de los 50 casos revisados; 22 casos (45.8%) tuvieron lesiones graves (5-6) e inmunopositividad alta para coronavirus; un caso (2%) presentó lesiones graves e inmunopositividad alta para rotavirus y 13 casos (27%) tuvieron lesiones graves e inmunopositividad alta para ambos virus. La inmunohistoquímica es una herramienta importante para el diagnóstico de rotavirus y coronavirus, principales virus involucrados en el Síndrome Diarreico Neonatal (SDN).

INTRODUCCIÓN

Síndrome Diarreico Neonatal

Rotavirus y coronavirus, forman parte del Síndrome Diarreico Neonatal (SDN) que causa diarreas en becerros. Dicho síndrome es de etiología multifactorial, en la que intervienen factores tales como: el hospedero, el ambiente (manejo) y agentes infecciosos. Los principales factores relacionados al huésped incluyen la salud general, nutrición, inmunidad a patógenos específicos, y la edad de la exposición. Dentro de los factores de los patógenos se incluyen el número de partículas infecciosas, número de enfermedades concurrentes, y la virulencia del (los) agente(s). El SDN es una patología común en todo el mundo, que afecta al becerro recién nacido, ocasiona alta morbilidad y cuantiosas pérdidas económicas. Clínicamente suele presentarse desde las 12 horas de vida hasta los primeros 35 días de vida y se caracteriza por excreción de heces acuosas y profusas, deshidratación progresiva y, en casos graves, muerte en pocos días (Figuras 1 y 2). La repercusión económica es importante ya que su elevada incidencia (superior al 60%) implica tratamientos, demanda de tiempo y mano de obra. Además, los porcentajes de mortalidad pueden llegar a ser hasta del 20%.^{1, 2, 3, 4, 5} Aunque en el SDN existen una numerosa lista de agentes infecciosos involucrados (bacterias, virus, protozoarios y hongos) y no infecciosos (dietarios), se ha comprobado que el rotavirus bovino del grupo A y el coronavirus bovino son los dos principales patógenos virales involucrados.^{1, 2, 3, 6, 7, 8}

La prevalencia de las diarreas causadas por estos virus varía dependiendo del país y la región.⁹ En un estudio realizado por Mohhamed et al¹⁰, en Algeria la incidencia de coronavirus bovino fue de 20,73%. En otros estudios se encontró algo similar, Brandão et al¹¹ en Brasil (22.22%), Stipp et al¹² en Brasil (19%) Akam et al¹³ en Algeria (18.48%%) e Izzo et al¹⁴ en Australia (21.6%). En otros países la incidencia es más baja, como lo informado por Reynolds et al¹⁰ en Inglaterra (14%), Snodgrass et al¹⁰ en Escocia (4%), Pérez et al¹⁵ en Costa Rica (9%), De la Fuente et al¹⁶ en España (7.34%), Rai et al¹⁷ en la India (11.76%) y Dash et al¹⁸ en la India (4.76%). Por otra parte, en Escocia Abraham et al¹⁹ encontró que la incidencia de coronavirus bovino fue de 38.9%. En el caso de rotavirus en el mismo estudio realizado por Mohhamed et al¹⁰ encontró que la prevalencia de dicho virus en Algeria fue de 14.63%; hallazgo similar a lo encontrado por Abraham et al¹⁹ en Escocia (16,7%), Rai et al¹⁷ en la India (15,68%), y Al-Robaiee y Al-Farwachi⁹ en Iraq (15,5%). En otros estudios la tasa registrada por Zrelli et al¹⁰ en Túnez fue de 22.8%, Langoni et al²⁰ en Brasil encontró una tasa de 25.1% y AKam et al¹³ en Algeria encontró un porcentaje de 21.84%. Otros autores encontraron tasas mayores para rotavirus como Reynolds et al¹⁰ en Inglaterra (42%), Snodgrass et al¹⁰ en Escocia (50%), De la Fuente et al¹⁶, en España (42.7%), Izzo et al¹⁴, en Australia (79.9%) y Nourmohammadzadeh et al²¹ en Irán (34%). Una tasa más baja registró Pérez et al¹⁵ en Costa Rica la cual fue del 7%. Dichas diferencias se pueden atribuir a los métodos de diagnóstico utilizados, las prácticas de mantenimiento utilizadas, el estatus higiénico, las condiciones ambientales y las condiciones del clima relacionadas con la localización geográfica.^{10, 22, 23}

La tasa de morbilidad de rotavirus y coronavirus bovino es elevada, oscilando entre 50-100%.^{24, 25} La tasa de mortalidad de rotavirus es en promedio del 5-20%.^{8, 26} La tasa de mortalidad de coronavirus bovino puede alcanzar hasta el 50%.^{27, 24}

El rotavirus y el coronavirus bovino son agentes que pertenecen a diferentes familias y tienen características diferentes.^{2, 3} Sin embargo, comparten características similares que permiten su ubicuidad en conjunto, tales como: la estabilidad en pH bajo, labilidad al calor en presencia de enzimas proteolíticas y su transmisión a través de la vía fecal-oral.^{2, 3, 8} Ambos virus ocasionan cambios patológicos similares, al inducir la atrofia de las vellosidades intestinales y ocasionar cuadros diarréicos.^{1, 2, 3} En infecciones naturales, se ha demostrado que ambos patógenos pueden estar involucrados simultáneamente.^{2, 3}

ROTAVIRUS

Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), los rotavirus pertenecen a la familia Reoviridae, subfamilia Sedoreoviridae.^{7, 8, 26, 28, 29} Dichos virus son clasificados en 7 grupos (A-G), de los cuales el del grupo A es el principal causante de diarrea en bovinos.^{2, 6, 8, 26, 28, 29} Las infecciones por rotavirus son causa importante de diarrea en niños y animales jóvenes como: becerros, ratones, corderos, lechones, cachorros, potros, aves, conejos, entre otros. La patogenia y lesiones son similares; no son específicos de especie, sin embargo tienen bajo potencial zoonótico.^{7, 8, 26, 28, 30}

Morfología

Los rotavirus son icosaédricos, de 70-100 nm de diámetro y sin envoltura, con 32 capsómeros y 11 segmentos de ARN de doble cadena, están protegidos por una cápside interna y externa. Los viriones tienen una apariencia distintiva ya que la cápside externa semeja a una rueda (del latín rota, rueda).^{4, 26, 30} Los rotavirus del grupo A codifican seis proteínas estructurales (VP1-4, VP6, VP7) y seis no estructurales (NSP1-6)^{26, 29, 30} Las proteínas estructurales están localizadas en el núcleo viral (VP1, VP2, y VP3), en la cápside interna (VP6) y en la cápside externa (VP4 y VP7). Las proteínas VP4 y VP7 son inmunogénicas y los hospederos pueden generar anticuerpos neutralizantes que protegen a los animales de las infecciones; la VP6 es un antígeno específico de grupo que es común en todos los rotavirus; y VP1, VP2 y VP3, junto con otras proteínas no estructurales, juegan un papel clave en la transcripción viral (Figura 3).^{7, 26, 29, 30} Las proteínas no estructurales coordinan y regulan la traducción del ARNm viral; además, están involucradas en antagonizar la respuesta antiviral del huésped y permitir la replicación del virus.^{30, 31, 32}

Patogenia

Después de la ingestión del virus, pasa a través del tracto digestivo hasta el yeyuno donde el agente infecta las células epiteliales, produciendo lesiones iniciales en la porción anterior del intestino (duodeno) que progresan distalmente hacia yeyuno e íleon.^{7, 28, 26} Se ha propuesto que los viriones se unen a receptores celulares, como integrinas o el ácido siálico, y así los componentes de la cápside interna son internalizados en la célula.^{28, 26} Se ha informado que sólo las células

epiteliales columnares diferenciadas que recubren la mitad apical de las vellosidades son susceptibles a ser infectadas. La entrada y replicación no se produce en células inmaduras o proliferantes de las criptas ya que estas células pueden carecer de receptores para el virus. El periodo de incubación es extremadamente corto (12-24 h), los signos y lesiones pueden aparecer en cuestión de horas donde las cisternas del retículo endoplásmico y de la mitocondria se distienden y las partículas virales se acumulan en los lisosomas y en las cisternas dilatadas.^{7, 8, 28} Las células epiteliales se vuelven vacuoladas, pierden las microvellosidades, se desprenden prematuramente hacia el lumen intestinal y los virus son eliminados por lisis del epitelio dañado (antes o después de la exfoliación), lo que provoca que las vellosidades intestinales sufran de atrofia. El epitelio de la mucosa es recubierto por células cúbicas, poco diferenciadas con microvellosidades mal definidas y que contienen vacuolas en su citoplasma.^{28, 26, 33} En los animales que se recuperan, las vellosidades se regeneran en 3 ó 4 semanas.^{7, 26} En infecciones por rotavirus del Grupo B, se ha observado que las células forman sincitios en la superficie de la vellosidad por fusión de enterocitos.⁷

La patogenia de la diarrea se desarrolla por tres mecanismos. El primero es por la mala absorción secundaria a la destrucción de enterocitos, además ésta pérdida de enterocitos maduros contribuye a una deficiencia sistémica de bicarbonatos, sodio, potasio, cloruro y agua causando acidosis metabólica; el segundo mecanismo, es porque las células epiteliales infectadas liberan agentes vasoactivos, lo que causa isquemia de las vellosidades y activación del sistema

nervioso entérico; el tercero, rotavirus es capaz de producir proteínas no estructurales como la NSP4, que actúa como una enterotoxina secretora que altera la homeostasis celular, aumentando las concentraciones intracelulares de calcio.^{8, 28, 26} Las partículas virales son eliminadas en las heces, la cual es la principal fuente de diseminación de la enfermedad, ya sea por contacto directo o por agua contaminada. En todas las especies, las enteritis rotavirales son más severas cuando se complican con infecciones simultáneas con *Escherichia coli* enterotoxigénica.^{7, 8, 28}

Este padecimiento aparece en las primeras dos a tres semanas de vida, afecta a la mayoría del rebaño y causa la muerte de más de la mitad de los animales infectados. El principal signo son las heces acuosas de color amarillo, que conlleva a deshidratación severa.^{7, 8, 26, 33}

Los becerros pueden excretar el virus a través de las heces desde el segundo día de infección, hasta los 7 a 8 días. Después de los 3 meses de edad, generalmente los becerros no están infectados.²⁶

CORONAVIRUS

Acorde con el ICTV, el coronavirus bovino pertenece al orden Nidovirales, familia Coronaviridae, género Betacoronavirus y especie Betacoronavirus 1.^{8, 34} Varias especies animales son afectadas por más de un tipo de coronavirus, las cuáles son causa importante de gastroenteritis, aunque pueden llegar a causar problemas respiratorios, hepatitis, encefalomiелitis, serositis, entre otros.^{7, 8, 28, 35} El coronavirus bovino se asocia con tres síndromes en el ganado, los cuales son:

disentería del invierno en el ganado adulto, enfermedad respiratoria en diversas edades y la diarrea neonatal de los terneros.^{8, 34, 35, 36, 37}

Morfología

Los coronavirus son esféricos, de 120-160 nm de diámetro, envueltos y poseen un genoma ARN de cadena simple. Su envoltura está formada por una doble capa lipídica con cinco tipos de proteínas estructurales: la nucleocápside (N), la transmembranal (M), la hemaglutinina/esterasa (HE), la espiga (S) y las proteínas pequeñas de membrana (E), que se proyectan hacia la misma, dándole apariencia de corona (Figura 4).^{7, 34, 36, 38} Las proteínas estructurales, están involucradas en la síntesis del ARN viral (N), lideran la formación de partículas virales (M); contribuyen a la hemoaglutinación y hemoadsorción del virus (HE y S) y en la salida de los viriones (E y M); entre otras funciones.^{27, 38}

Patogenia

El virus infecta en primer lugar la mucosa nasal, donde se produce una replicación intensiva. Grandes cantidades de virus son posteriormente ingeridas junto con las secreciones de moco y son transportados al sistema gastrointestinal. Coronavirus infecta y se replica en el citoplasma apical de los enterocitos, en las puntas y los planos laterales de las vellosidades intestinales del intestino delgado así como el colon, algunas especies del virus se dirigen a macrófagos tisulares.^{8, 28, 35, 37} El virus se adhiere a los enterocitos a través de la espiga y la hemaglutinina, que también permite la fusión de la envoltura viral con la membrana celular o a través de vesículas endocíticas.^{28, 39} La replicación y maduración parece implicar la

gemación de los viriones desde el citosol a través de la membrana y en el lumen de vacuolas de las cisternas en el retículo endoplásmico liso, donde se acumulan. Los viriones se pueden encontrar en los túbulos del Aparato de Golgi, por lo que pueden salir de las células mediante exocitosis. El virus es liberado por lisis de las células infectadas. Los cambios en las células infectadas ocurren alrededor de 12-24 horas. La mitocondria de las células infectadas se hincha, las cisternas del retículo endoplásmico (liso y rugoso) se dilatan, el citoplasma de las células infectadas pierde densidad electrónica, y las células pierden su acomodo columnar. El epitelio dañado puede lisarse *in situ*, liberando el virus retenido en vacuolas citoplasmáticas, o pueden exfoliarse en el lumen. La exfoliación del epitelio dañado puede ser masiva en un corto periodo de tiempo, dando lugar a la atrofia de vellosidades. Las vellosidades pueden fusionarse y durante la fase de exfoliación, estas pueden quedar “desnudas”. Los enterocitos en la vellosidades después del periodo de exfoliación son poco diferenciados, pierden su arreglo columnar, y se vuelven cuboidales o escamosos con sus microvellosidades acortadas e irregulares. Durante los dos a tres días posinfección (dpi), las vellosidades pueden regenerarse y los enterocitos se vuelven progresivamente columnares, pero carecen de un borde de cepillo bien desarrollado y enzimas. La defectiva absorción de grasas, se ve reflejada en la acumulación de gotas de lípidos en el citoplasma de los enterocitos. ^{1, 7, 28, 37, 39}

Puede existir inflamación aguda focal en la lámina propia de las vellosidades desnudas e infiltrado mononuclear en la lámina propia. La hiperplasia del epitelio

de las criptas usualmente resuelve la atrofia de vellosidades, restaurando la función normal.^{28, 37}

La diarrea ocurre debido a la mala absorción de nutrientes y electrolitos, con la contribución de la secreción de células de las criptas y probablemente por el epitelio de superficie pobremente diferenciado. Los animales presentan deshidratación progresiva, acidosis e hipercalemia, se vuelven letárgicos y pueden morir por hipovolemia, hipoglucemia y de cardiotoxicidad por incremento en las concentraciones de potasio. La diarrea en animales sobrevivientes suele resolverse en los 5 a 6 dpi.^{1, 8, 28, 37, 39}

En becerros, el coronavirus bovino es una causa común de diarrea en animales de hasta las tres semanas de edad, pero la enfermedad se puede producir en animales con un máximo de tres meses de edad.⁸

Diagnóstico

Rotavirus es el patógeno entérico viral más común que se diagnostica en las heces de becerros diarreicos y coronavirus es el segundo; sin embargo, al realizar necropsias de becerros, Blanchard et al y Oliveira et al encontraron que coronavirus ocupa el primer lugar y rotavirus el segundo.^{1, 5} Esto refleja que probablemente Coronavirus causa una enfermedad más grave que resulta en la muerte de los becerros en comparación con las infecciones por rotavirus; aunque múltiples enteropatógenos se encuentran comúnmente involucrados con ambos agentes.^{1, 8, 39}

Existen varios métodos de detección para ambos virus, entre ellos se encuentran el PCR, ELISA, microscopía electrónica (ME), inmunohistoquímica (IHQ), entre otras; además rotavirus puede detectarse con aglutinación y electroforesis (PAGE).^{1, 8, 40}

Para rotavirus, en muestras de diagnóstico, la ELISA y la ME coinciden en el número de casos positivos en un rango del 85% al 96% y en muestras de desafío experimental coinciden en un 100%.^{1, 6} Algunos juegos de reactivos comerciales de ELISA presentan baja sensibilidad (78%) y especificidad (68%) en muestras de diagnóstico.^{1, 41} En el caso de coronavirus, en muestras de diagnóstico, la ELISA y la ME coinciden en la positividad del 88% al 96%.^{1, 6, 42} Se ha observado que algunas de estas variaciones en el nivel de coincidencia de los casos positivos es debido a que se utilizan diferentes anticuerpos contra el virus de interés, lo que resulta en diferente sensibilidad y especificidad.^{1, 8}

En un estudio compararon la coincidencia de muestras que resultan positivas entre la técnica de anticuerpos fluorescentes (TAE) y la ME, siendo del 33%.; esto se debe a que la TAE no es tan factible en el intestino delgado, porque las células de la punta de vellosidades infectadas sufren desprendimiento y necrosis. Esto, combinado con la pérdida *postmortem* de las células epiteliales infectadas, conduce a resultados falsos negativos.¹ En otro estudio, se compararon la IHQ, ELISA, y ME para la detección de coronavirus en casos de diarrea de becerros; la coincidencia de muestras que resultaron positivas entre las 3 técnicas fue del 93%.⁴³ Para coronavirus, se comparó la sensibilidad relativa de la TAE, la IHQ y la ME obteniendo de 63% a 80% y 83%, respectivamente; por lo que el uso de la

IHQ es una gran alternativa para el diagnóstico.^{1, 43} Para coronavirus, el colon es un sitio más factible para TAE porque las células infectadas son retenidas en las criptas y menos susceptibles a la pérdida *post mortem*.¹

No existe prueba que detecte un patógeno con el 100% de precisión ya que cada método tiene limitaciones.¹ La detección de un agente infeccioso en las heces diarreicas no resulta confiable porque los enteropatógenos pueden ser excretados por animales sanos.^{1, 6, 43, 44} Es por esto que la detección y localización directa de un agente, así como la asociación con las lesiones producidas proporcionan un diagnóstico más preciso, como es el caso de la IHQ.^{40, 43, 44}

Tratamiento de la diarrea

El tratamiento de los becerros afectados está fundamentado en contrarrestar las alteraciones electrolíticas causadas por la diarrea y debe realizarse basado en los signos clínicos y, si es posible en los datos de laboratorio, incluyendo análisis de gases en sangre, para determinar el grado de acidosis metabólica, glucosa en sangre y alteraciones electrolíticas; sin embargo, no es una práctica común debido a los costos que implica y el curso agudo del cuadro clínico. Los objetivos del tratamiento deben seguir las mismas pautas generales como las recomendadas para la diarrea causada por otros agentes. El tratamiento debe incluir la corrección de la pérdida de líquidos y deshidratación, desequilibrio electrolítico, acidosis, hipoglucemia e hipotermia.³⁷

Esta corrección se logra principalmente a través de la administración de electrolitos orales o terapia intravenosa de fluidos, y la provisión de un ambiente

cálido y seco. Actualmente, existen cuadros que determinan el porcentaje de deshidratación y protocolos para el tratamiento de la diarrea. La selección del tipo de fluidos, la cantidad para proporcionar, y la tasa y vía de administración están basadas en la edad y el peso del animal, severidad y duración de los signos clínicos, el nivel de acidosis metabólica, y si el ternero afectado tiene reflejo para mamar.^{8, 37, 45, 46}

Prevención y control

Las buenas prácticas de manejo juegan un papel importante en la resistencia que los terneros tengan a la infección, como la prevención de distocias, la administración de cantidades de calostro y una dieta adecuada. Asimismo, las correctas prácticas de higiene en el espacio de parto, alimentación y estancia pueden disminuir la cantidad de agentes patógenos.^{8, 45} Los factores de riesgo que han sido identificados son: prácticas de higiene, el tamaño del hato, la edad y la prevalencia de uno o ambos patógenos, debido a que el aumento en la prevalencia de uno generalmente aumenta el riesgo de que otro patógeno esté involucrado, ya que puede haber co-infección.⁸

En bovinos se han desarrollado vacunas comerciales contra rotavirus y se pueden administrar a las hembras gestantes, lo que proporciona un alto nivel de anticuerpos en el calostro. Otras vacunas comerciales también contienen antígenos contra *Escherichia coli* y coronavirus. En la actualidad, en México se utiliza la vacuna Scoguard®4 (K/C) (Zoetis), utilizada en sistemas de producción de carne y leche. Dicha vacuna es de tipo multipropósito y contiene cepas

inactivadas de rotavirus, coronavirus y *E. coli* K99, además está formulada con toxoide de *Clostridium perfringens* tipo C y gentamicina como conservador. Las dificultades que presenta la aplicación de vacunas con genotipos no endémicos radican en que no son específicas y pueden presentar una deficiente o nula actividad inmunogénica debido a que la eficacia de una vacuna depende de la homología con los agentes endémicos y a los diferentes grados de virulencia de cada genotipo. ^{4, 8, 45}

JUSTIFICACIÓN

El cuadro clínico, las lesiones macroscópicas y microscópicas causadas por rotavirus y coronavirus bovino son similares, lo que dificulta el diagnóstico preciso. Es por ello que el diagnóstico a través de pruebas complementarias, como la inmunohistoquímica, permite determinar la presencia del antígeno viral en el sitio de lesión, lo cual es de suma importancia para ponderar la presencia de rotavirus y/o coronavirus, asociado a enteritis en becerras, de esta manera es posible establecer medidas de control y prevención adecuadas en este tipo de enteritis. ^{1,}

2, 3, 6, 8, 39, 40

HIPÓTESIS

La inmunohistoquímica es un método diagnóstico que permitirá diferenciar las enteritis causadas por rotavirus y coronavirus.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la utilidad de la técnica de inmunohistoquímica en el diagnóstico de enteritis causadas por rotavirus y coronavirus en becerras.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar e identificar las lesiones microscópicas causadas por rotavirus y coronavirus en muestras de intestino de becerras de Tizayuca, Hidalgo, que hayan presentado cuadro diarreico.
2. Estandarizar la técnica de inmunohistoquímica para establecer el diagnóstico de enteritis virales causadas por rotavirus y coronavirus.
3. Comparar, analizar y correlacionar las lesiones asociadas a rotavirus y coronavirus mediante histopatología e inmunohistoquímica, en intestinos de becerras.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras biológicas

El presente trabajo corresponde a un estudio observacional, retrospectivo, transversal y descriptivo entre los años 2008 a 2012. Se utilizaron 50 muestras de intestino incluidas en parafina, de becerras entre 1 a 3 semanas de edad; las cuales presentaron signos clínicos de diarrea, así como lesiones macroscópicas y microscópicas sugerentes a enteritis virales. Las muestras fueron obtenidas de necropsias de becerras realizadas en el Centro de Enseñanza y Diagnóstico de Enfermedades de Bovinos, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Procesamiento de las muestras

Las muestras de intestino, ya incluidas en parafina, se cortaron a 5 μm de grosor en un microtomo¹, realizando tres cortes seriados y montadas en laminillas. Uno de los cortes fue teñido con la técnica de rutina de hematoxilina y eosina para su observación y evaluación microscópica; los otros dos cortes fueron montados en laminillas tratadas previamente con la solución adhesiva Poli-L-Lysina² al 1%, y se procesaron por inmunohistoquímica (IHQ) para la identificación de antígenos virales de rotavirus y coronavirus.

¹ Leica Instruments, Modelo 820, Catálogo 5991006 Nussloch, Germany

² Sigma-Aldrich Co. Catálogo P8920 St. Louis, MO 14508 USA

Evaluación histopatológica

Se revisaron las lesiones microscópicas en las muestras de intestino delgado y grueso de dichas becerras, las lesiones fueron evaluadas y clasificadas según su severidad como leve (1), moderado (2) o grave (3) y dependiendo su distribución como multifocal (MF), generalizada o difusa (D), focal (F) y zonalmente extensiva (ZE). Dichas características son enlistadas a continuación:

Característica a evaluar	Opción
Morfología de enterocitos de las vellosidades	Cúbica, cilíndrica, plana
Degeneración de enterocitos de las vellosidades	Severidad y distribución
Necrosis de enterocitos de las vellosidades	Severidad y distribución
Hiperplasia de células caliciformes	Severidad y distribución
Exfoliación de enterocitos de las vellosidades	Severidad
Morfología de enterocitos de las criptas	Cúbica, cilíndrica, plana
Degeneración de enterocitos de las criptas	Severidad y distribución
Necrosis de enterocitos de las criptas	Severidad y distribución
Hiperplasia de enterocitos de las criptas	Severidad y distribución
Criptitis	Severidad y distribución
Exfoliación de enterocitos de las criptas	Severidad
Relación Vellosidad : Cripta (Atrofia)	Relación normal 6:1 Leve: 4.5-5.9:1 Moderado: 3.0-4.4:1 Grave: ≤ 3.0:1
Fusión de vellosidades	Severidad y distribución
Infiltrado (enteritis)	Tipo, severidad y distribución
Edema	Severidad

Otros agentes	Cocos, bacilos <i>Cryptosporidium</i> sp.
Linfonecrosis	Severidad
Atrofia linfoide	Severidad
Observaciones	Hallazgos

Método de inmunohistoquímica

Las secciones se desparafinaron durante una hora en una estufa³ a 60°C. Los tejidos se sumergieron inmediatamente en xilol, realizando un lavado de 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Para la rehidratación de los tejidos, las laminillas se sumergieron progresivamente en concentraciones decrecientes de alcohol etílico: 100, 96, 70 y 50 %, realizando un lavado de 10 min en cada una de las concentraciones de alcohol etílico. Finalmente se sumergieron en solución amortiguada de fosfatos (PBS) pH de 7.2, realizando un lavado de 10 min a TA.

Para la recuperación antigénica, se aplicaron 50µl de pronasa al 0.1% (0.05 g de Proteasa⁴ + 50 ml Tris Buffer) incubados durante 10 minutos en cámara húmeda a 37°C en estufa⁵. Para detener esta reacción enzimática se sumergieron en PBS durante 5 minutos a TA.

Para inhibir la peroxidasa endógena de los tejidos, las secciones se trataron con peróxido de hidrógeno 30%⁶ y metanol absoluto⁷ en una relación 1:8 realizando

³ Chicago Surgical and Electrical Co. Catálogo 200 No. Serial 1065 Melrose Park, Illinois USA

⁴ Sigma Chemical Co. Catálogo P-5147 St. Louis, MO 14508 USA

⁵ Felisa, Modelo FE-291^a No- serie *0301077 Guadalajara, Jalisco México

⁶ JT Baker, Catálogo 218601 Estado de México

dos incubaciones de 30 minutos cada uno a TA. Posteriormente se hizo un lavado con PBS de 5 min a TA.

Para el bloqueo de inmunoglobulinas endógenas se decantó el PBS y se agregaron 50 µl de leche Svelty al 0.5% (0.5 g de leche Svelty + 10 ml PBS), homogenizado con vórtex⁸. Lo tejidos se incubaron durante 30 min en cámara húmeda a 37 °C en estufa⁹.

Anticuerpo primario

En la técnica de IHQ para la detección de coronavirus se utilizó un anticuerpo monoclonal comercial de ratón en contra de los antígenos de superficie (peplómeros) de Coronavirus Bovino¹⁰ a una dilución 1:500, durante toda la noche a 4°C.

En la técnica de IHQ para la detección de rotavirus se utilizó un anticuerpo policlonal comercial de borrego en contra de Rotavirus¹¹ (todos los serotipos) a una dilución de 1:500, durante toda la noche a 4°C.

Anticuerpo secundario

Se utilizó un anticuerpo secundario comercial para coronavirus anti-ratón de origen caprino¹² y para rotavirus, anti-borrego elaborado en conejo¹³, aplicando 50 µL

⁷ Técnica Química, Catálogo A1760 D.F. México

⁸ Labnet Internacional, Inc. Modelo S0100, No. Serie 307030644 Dubuque, Iowa 52001

⁹ Felisa, Modelo FE-291^a No- serie *0301077 Guadalajara, Jalisco México

¹⁰ GeneTex International Corporation, Catálogo GTX40364 Dongmei Rd., East Dist., Hsinchu City 300

¹¹ GeneTex International Corporation, Catálogo GTX39230 Dongmei Rd., East Dist., Hsinchu City 300

¹² Dako, DM822 EnVision FLEX /HRP Lexington, Kentucky Estados Unidos

¹³ Jackson InmunoResearch, Catálogo 313-035-003 Baltimore, West Grove, Estados Unidos

sobre el tejido. Dichos anticuerpos están elaborados a base de un polímero que contiene peroxidasa y anticuerpo secundario.

Para el revelado se aplicaron 50 µl de Diaminobencidina¹⁴ (DAB) (1 ml de Sustrato buffer DM823 + 1 gota de DMB). Bajo la observación del tejido en el microscopio óptico, se estableció el tiempo de reacción, no excediéndose de 5 min, con la finalidad de determinar el tiempo de revelado. Posteriormente, el tejido se sumergió en agua destilada; se contratiñeron las muestras con hematoxilina de Meyer¹⁵ durante 1 minuto y cada laminilla se cubrió por un cubreobjetos sellándola con resina histológica¹⁶.

Tejidos utilizados como testigos

- a) **Testigo positivo:** Se utilizaron dos secciones de intestino que fueron positivas para coronavirus bovino y rotavirus a través de la técnica de inmunohistoquímica, respectivamente. (Esta muestra fue donada por el Dr. Alfonso López Mayagoitia de la Universidad de la Isla del Príncipe Eduardo, Canadá).
- b) **Testigo negativo:** corresponden a secciones de intestino positivas para coronavirus bovino y rotavirus, respectivamente, a las cuales se les cambió el anticuerpo primario por PBS.

¹⁴ Dako, DM827 EnVision FLEX DAB + Chromogen Lexington, Kentucky Estados Unidos

¹⁵ Zymed Laboratories Inc. Catálogo 008001 San Francisco, CA 94080 USA

¹⁶ Zymed Laboratories Inc. Catálogo 95-6543 San Francisco, CA 94080 USA

Evaluación inmunohistoquímica

Para evaluar la inmunopositividad de cada caso se utilizó un microscopio óptico¹⁷.

Una reacción positiva se observa de color café-ocre en el citoplasma de las células epiteliales y/o macrófagos.

La inmunopositividad se clasificó en cuatro, de acuerdo a los objetivos utilizados para su evaluación microscópica en 10 campos, es decir, si la positividad se observa desde el objetivo panorámico (4x) corresponderá a un número 3, si se observa desde seco débil (10x) corresponderá a un número 2, si se observa desde seco fuerte (40x) corresponderá a un número 1; finalmente, si no se observa en ninguno de los anteriores será negativo. Esta positividad se observó en las secciones de intestino encontradas (duodeno, yeyuno, íleon y colon), así como en las células (células epiteliales y macrófagos).

La positividad de las células epiteliales se clasificó de acuerdo a la zona de la vellosidad como: 1/3 (1), 2/3 (2), 3/3 (3) y células descamadas (4).

¹⁷ Cambridge Instruments Inc. Modelo 1982 No. Serial 10497-0 Buffalo, NY 14215 USA

Relación de evaluación histopatológica con la inmunohistoquímica

Para evaluar de manera conjunta las lesiones histopatológicas con la inmunohistoquímica, se utilizó un método de correlación diseñado por Park et al⁴⁷ el cual consiste en medir la atrofia de las vellosidades intestinales de acuerdo a la relación de la longitud vellosidad:cripta y el grado de descamación de las vellosidades; dichas lesiones las clasificó de la siguiente manera:

Relación vellosidad cripta y grado de atrofia	
Relación	Grado
≥6:1	0= Normal
5.0-5.9:1	1= Leve
4.0-4.9:1	2= Moderado
3.0-3.9:1	3= Marcado
≤3.0:1	4= Severo

Grado de descamación de las células epiteliales	
Descamación	Grado
Sin descamación	0= Normal
Atenuación cúbica de la punta de la vellosidad	1= Leve
Descamación de porción apical	2= Moderado
Descamación de porción basal	3= Marcado
Descamación de criptas	4= Severo

Sin embargo, para fines prácticos y de acuerdo a los criterios de evaluación mencionados anteriormente, dicho método se adaptó a cuatro grados:

Relación vellosidad:cripta y grado de atrofia (Figuras 5-7)	
Relación	Grado
≥6:1	0= Normal
4.5-5.9:1	1= Leve
3.0-4.4:1	2= Moderado
≤3.0:1	3= Grave

Grado de descamación de las células epiteliales (Figuras 8-10)	
Descamación	Grado
Sin descamación	0= Normal
Atenuación cúbica de la punta de la vellosidad	1= Leve
Descamación de porción apical	2= Moderado
Descamación de porción basal	3= Grave

Estos cambios fueron evaluados mediante la medición de 10 vellosidades seleccionadas al azar en las secciones histológicas intestinales.

En el caso de la Inmunohistoquímica se utilizaron los mismos criterios mencionados anteriormente.

RESULTADOS

Estudio histopatológico

Morfología de los enterocitos de las vellosidades

De los 50 casos, sólo uno (2%) conservó la morfología cilíndrica normal, cuatro casos (8%) presentaron morfología cúbica exclusivamente, 30 casos (60%) tuvieron la morfología cúbica y cilíndrica, siete casos (14%) presentaron morfología cúbica, cilíndrica y plana, y 8 casos (16%) mostraron morfología cúbica y plana (Figura 11). Por lo tanto, 40 casos (98%) presentaron morfología cúbica de los enterocitos de las vellosidades.

Degeneración de los enterocitos de las vellosidades

De los 50 casos, dos (4%) no presentaron degeneración de los enterocitos de las vellosidades, cinco casos (10%) presentaron degeneración leve, de los cuales en un caso (2%) era generalizada y en cuatro casos (8%) fue multifocal. 20 casos (40%) mostraron degeneración leve a moderada, de los cuales en nueve casos (18%) era generalizada y en 11 casos (22%) fue multifocal. Nueve casos (18%) presentaron degeneración moderada, de los cuales en cinco casos (10%) era generalizada y en cuatro casos (8%) fue multifocal. Finalmente, 14 casos (28%) tuvieron degeneración moderada a grave, de los cuales en 12 casos (24%) era generalizada y en dos casos (4%) fue multifocal (Figura 12).

Necrosis de los enterocitos de las vellosidades

Dos casos de los 50 (4%), no presentaron necrosis de los enterocitos de las vellosidades, 15 casos (30%) presentaron necrosis leve, de los cuales en tres casos (6%) era generalizada y en 12 casos (24%) fue multifocal. Dos casos (4%) presentaron necrosis leve a moderada multifocal. 21 casos (42%) presentaron necrosis moderada, de los cuales en 8 casos (16%) era generalizada y en 13 casos (26%) era multifocal. Seis casos (12%) presentaron necrosis moderada a grave, de los cuales en 5 casos (10%) fue generalizada y en un caso (2%) era multifocal. En cuatro casos (8%) se observó necrosis grave, de los cuales en tres casos (6%) era generalizada y en un caso (2%) fue multifocal (Figura 13).

Hiperplasia de células caliciformes

De los 50 casos, en 12 (24%) no hubo hiperplasia de células caliciformes, tres casos (6%) presentaron hiperplasia leve difusa; en 17 casos (34%) se observó hiperplasia moderada, de los cuales en 15 casos (30%) fue generalizada y en 2 casos (4%) era multifocal. En ocho casos (16%) se observó hiperplasia moderada a grave generalizada y en 10 casos (20%) fue grave generalizada (Figura 14).

Descamación de enterocitos de las vellosidades

De los 50 casos, en dos (4%) no se pudo evaluar la descamación de enterocitos de las vellosidades debido a los avanzados cambios *postmortem*, en un caso (2%) fue leve a moderada, en 11 casos (22%) fue moderada, en tres casos (6%) fue moderada a severa y en 33 casos (66%) fue severa (Figura 15).

Morfología de los enterocitos de las criptas

De los 50 casos, en 11 (22%) los enterocitos de las criptas conservaron su morfología cilíndrica, en 31 casos (62%) presentaron morfología cúbica y cilíndrica, en cinco casos (10%) tuvieron morfología cúbica, cilíndrica y plana, en un caso (2%) tuvieron morfología cúbica y plana, en un caso (2%) presentaron morfología plana y cilíndrica, y en un caso (2%) la morfología era cúbica, plana y cilíndrica (Figura 16).

Degeneración de los enterocitos de las criptas

Cinco casos de los 50 (10%), no presentaron degeneración de los enterocitos de las criptas, 16 casos (32%) presentaron degeneración leve, de los cuales en dos casos (4%) era generalizada y en 14 casos (28%) fue multifocal. 15 casos (30%) mostraron degeneración leve a moderada, de los cuales en tres casos (6%) era generalizada y en 12 casos (24%) fue multifocal. 11 casos (22%) presentaron degeneración moderada, de los cuales en ocho casos (16%) era generalizada y en tres casos (6%) fue multifocal. Finalmente, 3 casos (6%) tuvieron degeneración moderada a grave, de los cuales en dos casos (4%) era generalizada y en un caso (2%) fue multifocal (Figura 17).

Necrosis de los enterocitos de las criptas

De los 50 casos, ocho (16%) no tuvieron necrosis de los enterocitos de las criptas, 21 casos (42%) presentaron necrosis leve multifocal. Un caso (2%) presentó necrosis leve a moderada multifocal. 15 casos (30%) mostraron necrosis moderada, de los cuales en cuatro casos (8%) era generalizada y en 11 casos (22%) fue multifocal. Dos casos (4%) presentaron necrosis moderada a grave multifocal. Finalmente, tres casos (6%) presentaron necrosis grave, de los cuales en dos casos (4%) fue generalizada y en un caso (2%) era multifocal (Figura 18).

Hiperplasia de los enterocitos de las criptas

Seis casos de los 50 (12%), no presentaron hiperplasia de las células de las criptas, cinco casos (10%) presentaron hiperplasia leve, de los cuales en tres casos (6%) fue generalizada y en dos casos (4%) fue multifocal. 27 casos (54%) presentaron hiperplasia moderada, de los cuales en 19 casos (38%) fue generalizada y en ocho casos (16%) era multifocal. Seis casos (12%) presentaron hiperplasia moderada a grave, de los cuales en cinco casos (10%) fue generalizada, y en un caso (2%) era multifocal. Finalmente, en seis casos (12%) se observó hiperplasia grave, de los cuales en cuatro casos (8%) fue generalizada y en dos casos (4%) era multifocal (Figura 19).

Criptitis

De los 50 casos, cuatro (8%) no presentaron criptitis supurativa, 17 casos (34%) presentaron criptitis supurativa leve multifocal. En cinco casos (10%) se observó criptitis supurativa leve a moderada, de los cuales en un caso (2%) fue generalizada y en 4 casos (8%) multifocal. 21 casos (42%) tuvieron criptitis supurativa moderada, de los cuales en un caso (2%) fue generalizada y en 20 casos (40%) era multifocal. En un caso (2%) se observó criptitis supurativa moderada a grave difusa. Finalmente, en dos casos (4%) se observó criptitis supurativa grave, de los cuales en uno (2%) fue generalizada y en otro (2%) era multifocal (Figura 20).

Descamación de enterocitos de las criptas

Seis casos de los 50 (12%), no presentaron descamación de los enterocitos, 12 casos (24%) presentaron descamación leve, en dos casos (4%) se observó descamación leve a moderada, 22 casos (44%) tuvieron descamación moderada, cuatro casos (8%) presentaron descamación moderada a grave y en cuatro casos (8%) fue grave (Figura 21).

Atrofia de vellosidades

De los 50 casos, dos (4%) tuvieron atrofia leve, en ocho casos (16%) se observó atrofia moderada y 40 casos (80%) presentaron atrofia grave (Figura 22).

Fusión de vellosidades

De los 50 casos, sólo uno (2%) no presentó fusión de las vellosidades, un caso (2%) presentó fusión leve multifocal, tres casos (6%) tuvieron fusión leve a moderada multifocal. 16 casos (32%) presentaron fusión moderada, de los cuales en tres casos (6%) fue generalizada y en 13 casos (26%) era multifocal. En siete casos (14%) se observó fusión moderada a grave, de los cuales en cuatro casos (8%) era generalizada y en tres casos (6%) fue multifocal. Finalmente, en 22 casos (44%) se observó fusión grave, de los cuales en 16 casos (32%) era generalizada y en 6 casos (12%) fue multifocal (Figura 23).

Enteritis

En todos los casos se observó enteritis compuesta por linfocitos, células plasmáticas e histiocitos. Seis casos (12%) presentaron enteritis leve, de los cuales en dos casos (4%) fue generalizada y en cuatro casos (8%) multifocal. Seis casos (12%) presentaron enteritis leve a moderada generalizada. 31 casos (62%) tuvieron enteritis moderada, de los cuales en 22 casos (44%) fue generalizada y en nueve casos (18%) era multifocal. Finalmente, en siete casos (14%) se observó enteritis moderada a grave, de los cuales en cuatro casos (8%) fue generalizada, y en tres casos (6%) era multifocal (Figura 24).

Edema

De los 50 casos, en dos (4%) no se observó edema, 18 casos (36%) tuvieron edema leve, un caso (2%) presentó edema leve a moderado, 24 casos (48%)

presentaron edema moderado, dos casos (4%) tuvieron edema moderado a grave y en tres casos (6%) se observó edema grave (Figura 25).

Bacterias

En 18 casos de los 50 (36%), no se observaron colonias bacterianas, en 17 casos (34%) se observaron bacilos, en seis casos (12%) se observaron cocos, y nueve casos (18%) tuvieron cocos y bacilos (Figura 26).

Otro (*Cryptosporidium spp.*)

En siete de los 50 casos (14%), se observaron estructuras parasitarias adheridas al epitelio compatibles con *Cryptosporidium spp.* (Figura 27).

Linfonecrosis

De los 50 casos, en 11 (22%) no se observó linfonecrosis o no se encontró tejido linfoide asociado, 21 casos (42%) tuvieron linfonecrosis leve, tres casos (6%) presentaron linfonecrosis leve a moderada y 15 casos (30%) tuvieron linfonecrosis moderada (Figura 28).

Atrofia linfoide

De los 50 casos, en 11 (22%) no se observó atrofia linfoide o no se encontró tejido linfoide asociado, cuatro casos (8%) presentaron atrofia leve, 23 casos (46%) tuvieron atrofia moderada, en dos casos (4%) se observó atrofia moderada a grave, finalmente, en 10 casos (20%) se observó atrofia grave (Figura 29).

Lesiones representativas

De acuerdo con los hallazgos histopatológicos, las características evaluadas más representativas, es decir, que se observaron por arriba del 60% de los casos evaluados, fueron las siguientes:

- Morfología cúbica de enterocitos de las vellosidades
- Descamación de enterocitos de las vellosidades
- Morfología cúbica de enterocitos de las criptas
- Atrofia de vellosidades

Inmunohistoquímica

Los 50 casos (100%) fueron positivos para coronavirus, y 47 casos (94%) fueron positivos para rotavirus.

Coronavirus

De los 50 casos revisados, 11 casos (22%) tuvieron positividad 1 (Figura 30), 33 casos (66%) presentaron positividad 2 (Figura 31) y en 6 casos (12%) se observó positividad 3 (Figuras 32, 33 y 34).

De las secciones de intestino revisadas: 49 casos (98%) presentaron positividad en intestino delgado; de los cuales en 12 casos (24%) se observó positividad 1, 24 casos (48%), tuvieron positividad 2 y en 13 casos (26%) se observó positividad 3 (Figura 35). 40 casos (80%) presentaron positividad en intestino grueso; de los cuales, 15 casos (30%) tuvieron positividad 1, 17 casos (34%) presentaron positividad 2 y 8 casos (20%) tuvieron positividad 3 (Figura 36).

La positividad en los 50 casos (100%) se observó en macrófagos, mientras que en 26 casos (52%) se observó en células epiteliales.

La positividad en los macrófagos, en 10 casos (20%) fue de 1, en 28 casos (56%) fue de 2 y en 12 casos (24%) fue de 3 (Figura 37).

La positividad en las células epiteliales, en siete casos (14%) fue de 1, en 10 casos (20%) de 2 y en nueve casos (18%) de 3 (Figura 38). De los casos positivos en las células epiteliales, dos casos (4%) presentaron positividad en todas las zonas, cuatro casos (8%) tuvieron positividad en el 1/3, 2/3 y en células

descamadas, en dos casos (4%) se observó positividad en el 1/3, 3/3 y en células descamadas, en cinco casos (10%) se observó positividad en el 1/3 y en las células descamadas, tres casos (6%) presentaron positividad en el 2/3 y 3/3, un caso (2%) presentó positividad en el 2/3, 3/3 y en células descamadas, cuatro casos (8%) tuvieron positividad en el 3/3, tres casos (6%) mostraron positividad en el 3/3 y en células descamadas, dos casos (4%) tuvieron positividad en células descamadas (Figura 39).

Rotavirus

33 casos de 50 (66%), tuvieron positividad 1 (Figura 40), 12 casos (24%) presentaron positividad 2 (Figura 41) y en dos casos (4%) se observó positividad 3 (Figuras 42 y 43); tres casos (6%) fueron negativos (Figura 44).

De las secciones de intestino revisadas: 43 casos (86%) presentaron inmunopositividad en intestino delgado; de los cuales, 31 casos (62%) tuvieron positividad 1, 11 casos (22%) presentaron positividad 2 y un caso (2%) tuvo positividad 3 (Figura 45). 25 casos (50%) presentaron inmunopositividad en intestino grueso, de los cuales en 18 casos (36%) se observó positividad 1, seis casos (12%) presentaron positividad 2 y un caso (2%) tuvo positividad 3 (Figura 46).

La positividad en 38 casos (76%) se observó en macrófagos, mientras que en 43 casos (86%) se observó en células epiteliales.

La positividad en los macrófagos, en 30 casos (60%) fue de 1, en seis casos (12%) de 2 y en dos casos (4%) de 3 (Figura 47).

La positividad en las células epiteliales, en 30 casos (60%) fue de 1, en 10 casos (20%) de 2 y en tres casos (6%) de 3 (Figura 48). De los casos positivos en las células epiteliales, un caso (2%) presentó positividad en el 1/3 y 2/3, un caso (2%) tuvo positividad en el 1/3, 2/3 y 3/3, en un caso (2%) se observó positividad en el 1/3, 2/3 y en células descamadas, en cinco casos (10%) se observó positividad en el 1/3, 3/3 y en las células descamadas, tres casos (6%) presentaron positividad en el 1/3 y en células descamadas, dos casos (4%) presentaron positividad en el 2/3, seis casos (12%) tuvieron positividad en el 2/3 y 3/3, tres casos (6%) mostraron positividad en el 2/3, 3/3 y en células descamadas, un caso (2%) tuvo positividad en el 2/3 y en células descamadas, nueve casos (18%) mostraron positividad en el 3/3, en dos casos (4%) se observó la positividad en el 3/3 y en células descamadas, y nueve casos (18%) presentaron positividad en células descamadas (Figura 49).

Relación entre el grado de lesión con la positividad mostrada en IHQ

Al establecer la relación entre el grado de lesión con el grado de positividad por inmunohistoquímica se encontró que de los 50 casos; 22 (45.8%) tuvieron lesiones graves (5-6) y tuvieron inmunopositividad de 2 a 3 para coronavirus; un caso (2%) presentó lesiones graves e inmunopositividad de 2 para rotavirus; 13 casos (27%) tuvieron lesiones graves e inmunopositividad 2 a 3 para ambos virus; en cuatro casos (8.3%) se observaron lesiones leves (≤ 4) e inmunopositividad 2 a 3 para coronavirus. En seis casos (12.5%) se observaron lesiones severas e inmunopositividad 1 para coronavirus y rotavirus; en dos casos (4.2%) se observaron lesiones leves e inmunopositividad 1 para ambos virus. En dos casos dicho método no pudo aplicarse porque sólo se observó atrofia de vellosidades, ya que las muestras presentaban avanzados cambios *postmortem*. (Figura 50) (Cuadro 1).

DISCUSIÓN

El SDN corresponde a un problema de bienestar y una de las principales causas de pérdidas económicas en el mundo debido a la mortalidad, costos de tratamiento y pobre crecimiento de las becerras. Donovan et al⁴⁸, observó que la presencia de diarrea en becerras antes de los seis meses causa reducción del crecimiento y la consecuente prolongación del tiempo de nacimiento al primer parto. En un estudio realizado en Kuwait, Razzaque et al⁴⁹ encontró que el costo por una muerte no deseada de un becerro se calculó en aproximadamente \$60 UD (\$1,040 MXN). Es por esto que el diagnóstico de esta patología por medio de técnicas como la inmunohistoquímica, brindan una nueva oportunidad para el MVZ ya que no sólo confirma el diagnóstico de algún agente en particular, sino que permite correlacionar las lesiones con la presencia o ausencia del antígeno *in situ*.

1, 2, 3, 6, 8, 39, 40

Las lesiones histológicas más representativas en el presente estudio, fueron las siguientes: cambio cuboidal de enterocitos de las vellosidades, descamación de enterocitos de las vellosidades, morfología cuboidal de enterocitos de las criptas y atrofia de vellosidades. Dichos hallazgos concuerdan con lo descrito por Jones et al⁷, Brown et al²⁸, Kim et al²⁹ y Park et al⁴⁷. La importancia de identificar las lesiones antes descritas, radica en que múltiples agentes pueden estar involucrados y en algunos, las lesiones que producen pueden llegar a ser muy similares, como en el caso de rotavirus, coronavirus y *Cryptosporidium* spp, es por esto que la inmunohistoquímica representa una herramienta útil para el diagnóstico de las enteropatías virales.

1, 2, 3, 6, 7, 8, 28, 39, 40

En este estudio, coronavirus fue el enteropatógeno mayormente asociado con la diarrea en becerras, ya que el 100% de los casos fueron positivos, en comparación con rotavirus, de los cuales el 94% de los casos resultaron positivos; sin embargo, en el 94% de los casos se identificaron ambos virus (coinfeción). En un estudio realizado por medio de SN-PCR por Barry et al⁵⁰ de 44 muestras de heces que habían sido positivas para rotavirus, sólo siete casos (15.9%) presentaron coinfección por coronavirus; en otro estudio realizado mediante PAGE, hemoaglutinación (HA) e inhibición de la hemoaglutinación (IHA) por Jerez et al⁵¹, de 72 muestras de heces analizadas, ocho casos (11%) fueron positivos para rotavirus, 26 casos (36%) resultaron positivos para coronavirus y dos casos (3%) presentaron infección asociada a ambos virus. Por otra parte, en un estudio realizado por RT-PCR por Brandão et al¹¹, de nueve muestras de heces, dos casos (22%) fueron positivos para coronavirus, seis casos (66%) resultaron positivos para rotavirus y en sólo un caso (11%) se observó coinfección por ambos virus. En otro estudio realizado por medio de PAGE y SN-PCR por Oliveira Filho et al⁵, de 100 muestras de heces evaluadas, 11 casos (11%) resultaron positivos para rotavirus, 14 casos (14%) fueron positivos para coronavirus y en 3 casos (3%) se observó coinfección por ambos virus. Actualmente, existen pocos estudios enfocados a evaluar la coinfección de ambos virus y cómo se comportan en el hospedador; por lo que no se ha determinado aún, si es que ambos virus compiten, y/o la presencia de uno limita o favorece la infección del otro.⁵⁰ Por su parte, Brandão et al¹¹ propone que existe un efecto sinérgico entre ambos virus en una infección mixta; sin embargo, la infección simultánea por estos virus no es suficiente para confirmar que actúan de forma sinérgica. Esta interacción se debe

medir con mayor precisión en condiciones experimentales y no en observaciones de campo.⁵⁰

La positividad que evidenció coronavirus fue mayor en comparación con la positividad mostrada por rotavirus. La localización de la positividad para coronavirus se centró en macrófagos y en células epiteliales, siendo más frecuente encontrarla en macrófagos ya que dichas células fueron inmunopositivas en los 50 casos (100%). La positividad para coronavirus se ubicó en todas las porciones de la vellosidad (1/3, 2/3, criptas y células descamadas), principalmente en la porción apical (1/3 y 2/3) de duodeno, yeyuno, íleon y colon. Esto concuerda con un estudio realizado por Bridger et al⁵², en el cual por medio de inmunofluorescencia observó positividad en la superficie de las vellosidades de íleon, ciego y colon, además de criptas colónicas y cecales; posteriormente Parsons et al⁴⁴, a través de inmunohistoquímica, confirmaría la localización de la positividad en dichas zonas, además de observarlo en las criptas de íleon.

Para rotavirus, la positividad se localizó en macrófagos y células epiteliales, siendo más frecuente encontrarla en células epiteliales ya que se observó en 43 casos (86%) dentro del citoplasma de los enterocitos. La positividad para rotavirus se localizó en todas las porciones de la vellosidad, y al igual que coronavirus, se observó más comúnmente en la porción apical (1/3 y 2/3) de yeyuno, íleon y colon. Dichos hallazgos, concuerdan con lo observado por Parsons et al⁴⁴, el cual a través de inmunohistoquímica, observó positividad en la porción apical de las vellosidades de intestino delgado, además de criptas cecales.

Existe relación entre las lesiones histopatológicas (atrofia de vellosidades y descamación de enterocitos) y la presencia del antígeno viral para ambos virus (Figura 50), lo que coincide con lo encontrado en estudios experimentales por Kim et al²⁹ y Park et al⁴⁷ para rotavirus y coronavirus, respectivamente. Sin embargo, en el presente trabajo, al ser un estudio observacional de campo la severidad y el curso de dichas lesiones es mayor, en comparación con lo encontrado por ambos autores. En el presente análisis, coronavirus es el patógeno mayormente involucrado con la presencia de lesiones más graves (en comparación con rotavirus), lo que concuerda con lo descrito por Blanchard et al¹ y Gelberg⁵³; seguido de la presencia de ambos virus y lesiones graves. La presencia de lesiones graves con positividad baja de ambos virus, probablemente refleja que en dichos casos, los animales cursaron con un proceso subagudo e incluso crónico (excesiva descamación) y/u otros patógenos estaban involucrados, sin embargo en ninguno de ellos se observó la presencia de *Cryptosporidium spp.*

La importancia del diagnóstico para cualquier agente involucrado en el SDN, no sólo radica en la presencia o ausencia del antígeno, en este caso coronavirus y/o rotavirus, sino que nos ayuda a establecer una relación entre la severidad de las lesiones con la positividad mostrada por uno o ambos virus; esto, aunado a otras pruebas o métodos diagnósticos, la inmunohistoquímica brinda al clínico un esquema amplio acerca de la salud del hato, la severidad de las lesiones causadas y la calidad del tratamiento que se le brinde a los becerros; así como en la detección oportuna de enfermedades subclínicas, las cuales representan un reto para el MVZ, ya que involucran gastos económicos importantes y las

consecuentes pérdidas. Además, la inmunohistoquímica brinda una nueva oportunidad para la elaboración de mapas epidemiológicos y datos de referencia acerca de estas enfermedades y la elaboración de vacunas que ayuden al control y prevención de dichas entidades ya que actualmente en México no existen datos epidemiológicos acerca de estos virus. Es importante recordar que no sólo la presencia de dichos agentes juega un papel importante en el SDN; ya que factores del ambiente, como el manejo y el estado general del hospedero; como la correcta inmunización de las becerras, en conjunto con el diagnóstico certero, son los elementos que ayudarán a disminuir el riesgo de la presentación de dicha patología. 1, 2, 3, 4, 6, 8, 39, 40

CONCLUSIONES

- Se detectaron antígenos virales de rotavirus y coronavirus mediante la técnica de inmunohistoquímica en enteropatías sugerentes de infecciones por uno o ambos virus.
- Es infructuoso clasificar histopatológicamente las lesiones causadas por coronavirus y rotavirus; sin embargo se identificaron las lesiones histológicas más representativas en enteropatías virales causantes del SDN.
- Se estandarizó la técnica de inmunohistoquímica para la identificación de rotavirus y coronavirus en muestras de intestino de becerras con signos clínicos de diarrea, así como lesiones macroscópicas y microscópicas sugerentes a enteritis virales.
- Mediante la inmunohistoquímica se compararon y analizaron las enteritis causadas por rotavirus, coronavirus o ambos; además, a través de un sistema de gradificación se relacionaron la severidad de las lesiones histológicas más representativas (atrofia de vellosidades y descamación de enterocitos) con la inmunopositividad, las cuales estaban relacionadas con la inmunopositividad para coronavirus, seguidas de coinfección por rotavirus y coronavirus.
- No se observó relación entre la gravedad de las lesiones con la presencia de patógenos no virales (*Cryptosporidium* spp., bacterias); sin embargo, la presencia ubicua de varios patógenos en las secciones de intestino indican

cuáles son los principales agentes involucrados en el SDN en la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo.

- Se debe promover el uso de otras técnicas moleculares para la determinación precisa de las cepas involucradas en las regiones de interés; este conocimiento es necesario para permitir el uso de vacunas eficaces para las cepas presentes en dichas áreas.

REFERENCIAS

1. Blanchard PC. Diagnostics of Dairy and Beef Cattle Diarrhea. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract* 2012;28(3):443-464.
2. Zhu W, Dong J, Haga T, Goto Y, Sueyoshi M. Rapid and sensitive detection of bovine coronavirus and group a bovine rotavirus from fecal samples by using one-step duplex RT-PCR assay. *J Vet Med Sci* 2011;73:531-534.
3. Aich P, Wilson HL, Kaushik RS, Potter A a, Babiuk L a, Griebel P. Comparative analysis of innate immune responses following infection of newborn calves with bovine rotavirus and bovine coronavirus. *J Gen Virol* 2007;88:2749-2761.
4. Rodriguez WA. Identificación de genotipos de Rotavirus Bovino prevalientes en México como herramienta para el desarrollo de una vacuna recombinante. (tesis de maestría). Morelos, México: Universidad Nacional Autónoma de México (Instituto de Biotecnología), 2007.
5. Oliveira Filho JP, Silva DPG, Pacheco MD, et al. Diarréia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: Estudo clínico e etiológico. *Pesqui Vet Bras* 2007;27(10):419-424.
6. Athanassious R, Marsolais G, Assaf R, et al. Detection of bovine coronavirus and type A rotavirus in neonatal calf diarrhea and winter dysentery of cattle in Quebec: evaluation of three diagnostic methods. *Can Vet J* 1994;35:163-169.

7. Jones TC, Hunt RD, King NW. The Digestive system: Diseases caused by virus. In: Jones TC, Hunt RD, King NW. Veterinary Pathology. 6^{ta} ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997: 281-288, 350-356.
8. Jakobsson S. Diagnosis and Molecular Epidemiology of Bovine Rotavirus and Coronavirus in Brazil. (tesis de licenciatura). Uppsala, Suecia: Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas (Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia), 2013.
9. Al-Robaiee IA. Al-Farwachi MI. Prevalence of rotaviral infection in diarrheic neonatal calves in Mosul city, Iraq. Vet World 2013;6(8):538-540.
10. Mohammed ASS, Mokhtaria R, Belkacem TB, Amrane AA, Ahmed RB, Yuva B, et al. Prevalence of rotavirus (GARV) and coronavirus (BCoV) associated with neonatal diarrhea in calves in western Algeria. Asian Pac J Trop Biomed 2014;4(Suppl 1):S318-S322.
11. Brandão PE, Villarreal LYB, Souza SLP De, Richtzenhain LJ, Jerez JA. Scientific Mixed Infections By Bovine Coronavirus, Rotavirus and *Cryptosporidium parvum* in an Outbreak of Neonatal Diarrhea in Beef Cattle. Arq Inst Biol 2007;74(1):33-34.
12. Stipp DT, Barry AF, Alfieri AF, Takiuchi E, Amude AM, Alfieri AA. Frequency of BCoV detection by a semi-nested PCR assay in faeces of calves from Brazilian cattle herds. Trop Anim Health Prod. 2009;41(7):1563-1567.
13. Khelef D, Saïb MZ, Akam a, Kaidi R, Chirila V, Adjou VCKT. Épidémiologie de la cryptosporidiose chez les bovins en Algérie. Revue Méd Vét 2007;158(5):260-264.

14. Izzo MM, Kirkland PD, Mohler VL, Perkins NR, Gunn a a, House JK. Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Aust Vet J* 2011;89(5):167-173.
15. Pérez E, Kummeling a, Janssen MM, et al. Infectious agents associated with diarrhoea of calves in the canton of Tilarán, Costa Rica. *Prev Vet Med* 1998;33(1-4):195-205.
16. De la Fuente R, García a, Ruiz-Santa-Quiteria J a, et al. Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. *Prev Vet Med* 1998;36(2):145-152.
17. Rai RB, Hansha A, Rai S, et al. Prevalence of rota and coronavirus infections in calves of Barabanki and Raebareli districts of Uttar Pradesh. *Indian J Vet Pathol* 2011;35(1):73-74.
18. Dash S, Kumar K, Goel a, Bhatia a. Detection of Corona virus antigen by ELISA from diarrhoeic cow calves in Mathura, India. *Vet World*. 2012;5(3):166-168.
19. Abraham G, Roeder PL. Agents associated with neonatal diarrhoea in Ethiopian Dairy Calves. *Trop Anim Hith Prod* 1992;24:74-80.
20. Langoni H, Avila FA De, Linhares AC, Da Silva AV, Elias AO. Contribuição ao estudo da etiologia das diarreias em bezerros de aptidão leiteira no estado de São Paulo, Brasil. *Brazilian J Vet Res Anim Sci* 2004;41:313-319.
21. Nourmohammadzadeh F, Davoudi Y, Abdollahpour G, Nouri A. The prevalence of rotavirus in neonatal calf diarrhoea, using electron microscopic examination. *Comp Clin Path* 2012;21(6):1231-1234.

22. Ok M, Güler L, Turgut K, et al. The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of Escherichia coli strains by multiplex PCR. Zoonoses Public Health 2009;56(2):94-101.
23. Mayameei A, Mohammadi G, Yavari S, Afshari E, Omidi A. Evaluation of relationship between Rotavirus and Coronavirus infections with calf diarrhea by capture ELISA. Comp Clin Path 2010;19(6):553-557.
24. McArthur D. Bovine Coronavirus Infection: Clinical Syndromes in Adult Cattle and Calves. 1997 [cited 2015 April 12]. Available from: URL: <https://www.addl.purdue.edu/newsletters/1997/spring/bci.shtml>.
25. McNulty MS. The Etiology , Pathology and Epidemiology of Viral Gastroenteritis Rotavirus Infections in Calves. Annales de Recherches Vétérinaires 1983;14(4):427-432.
26. Dhama K, Chauhan RS, Mahendran M, Malik SVS. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. Vet Res Commun 2009;33:1-23.
27. Betancourt M A, Rodriguez B E, Barrera V M. Coronavirus bovino : Infecciones neumoentéricas Revista Electrónica de Veterinaria 2006;7(12):1-28.
28. Brown CC, Baker DC, Barker IK. System alimentary: Viral diseases of the alimentary tract. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N: Pathology of Domestic Animals. 5^{ta} ed. Philadelphia: Elsevier, 2007:169-176.
29. Kim HJ, Park JG, Matthijnssens J, et al. Intestinal and extra-intestinal pathogenicity of a bovine reassortant rotavirus in calves and piglets. Vet Microbiol 2011;152(3-4):291-303.

30. Dennehy PH. Rotavirus Vaccines: an Overview. Clin Microbiol Rev 2008;21(1):198-208.
31. Hu L, Crawford SE, Hyser JM, Estes MK, Prasad BVV. Rotavirus non-structural proteins: Structure and function. Curr Opin Virol 2012;2(4):380-388.
32. Palombo EA, Bishop RF. Rotaviruses. eLS:Citable reviews in the life sciences 2001:1-10.
33. Varshney KC, Bridger JC, Parsons KR, Cook R, Teucher J, Hall GA. The lesions of rotavirus infection in 1- and 10-day-old gnotobiotic calves. Vet Pathol 1995;32:619-627.
34. Asano KM, Souza SP, Silva SOS, Richtzenhain LJ, Brandão PE. Rapid detection of bovine coronavirus by a semi-nested RT-PCR. Pesqui Veterinária Bras 2009;29(11):869-873.
35. Han MG, Cheon D-S, Zhang X, Saif LJ. Cross-protection against a human enteric coronavirus and a virulent bovine enteric coronavirus in gnotobiotic calves. J Virol 2006;80(24):12350-12356.
36. Khalili M, Morshedi A, Keyvanfar H, Hemmatzadeh F. Detection of bovine coronavirus by RT-PCR in a field study. Vet Arh 2006;76(4):291-296.
37. Boileau MJ, Kapil S. Bovine Coronavirus Associated Syndromes. Vet Clin North Am - Food Anim Pract 2010;26(1):123-146.
38. Weiss SR, Leibowitz JL. Coronavirus Pathogenesis. Advances in Virus Research 2011;81:85-164.
39. Foster DM, Smith GW. Pathophysiology of Diarrhea in Calves. Vet Clin North Am - Food Anim Pract 2009;25(1):13-36.

40. Zhang Z, Andrews GA, Chard-Bergstrom C, Minocha HC, Kapil S. Application of immunohistochemistry and in situ hybridization for detection of bovine coronavirus in paraffin-embedded, formalin-fixed intestines. *J Clin Microbiol* 1997;35(11):2964-2965.
41. Maes RK, Grooms DL, Wise AG, et al. Evaluation of a human group A rotavirus assay for on-site detection of bovine rotavirus. *J Clin Microbiol* 2003;41(1):290-294
42. Tahir RA, Pomeroy KA, Goyal SM. Evaluation of shell vial cell culture technique for the detection of bovine coronavirus. *J Vet Diagn Invest* 1995;7(3):301-304.
43. Dar AM, Kapil S, Goyal SM. Comparison of immunohistochemistry, electron microscopy, and direct fluorescent antibody test for the detection of bovine coronavirus. *J Vet Diagn Invest* 1998;10:152-157.
44. Parsons KR, Wilson AM, Hall GA, Bridger JC, Chanter N, Reynolds DJ. Localisation of enteropathogens in paraffin embedded tissue by immunoperoxidase. *J Clin Pathol* 1984;37(6):645-650.
45. Lorenz I, Fagan J, More SJ. Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves. *Ir Vet J* 2011;64(1):9.
46. Smith GW. Treatment of Calf Diarrhea: Oral Fluid Therapy. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract* 2009;25(1):55-72.
47. Park SJ, Kim GY, Choy HE, et al. Dual enteric and respiratory tropisms of winter dysentery bovine coronavirus in calves. *Arch Virol* 2007;152:1885-1900.

48. Donovan GA, Dohoo IR, Montgomery DM, Bennett FL. Calf and disease factors affecting growth in female holstein calves in Florida, USA. *Prev Vet Med* 1998;33:1-10.
49. Razzaque MA, Bedair M, Abbas S, Al-Mutawa T. Economic impact of calf mortality on dairy farms in Kuwait. *Pak Vet J.* 2009;29(3):97-101.
50. Barry AF, Alfieri AF, Stipp DT, Alfieri AA. Bovine Coronavirus Detection in a Collection of Diarrheic Stool Samples Positive for Group A Bovine Rotavirus. *Brazilian Arch Biol Technol* 2009;52:45-49.
51. Jerez JA, Buzinaro MG, Gregori F, Ito FH, Sakai T, Paiva D. Detecção De Rotavírus E Coronavírus Em Fezes De Bezerros. *Arq Inst Biol* 2002;69(2):19-23.
52. Bridger JC. Isolation of coronaviruses from neonatal calf diarrhoea in Great Britain and Denmark. *Veterinary Microbiology* 1978;3:101-113.
53. Gelberb HB. Alimentary system. In: McGavin MD, Zachary JF: *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4^{ta} ed. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier, 2007: 359-360.

FIGURAS



Figura 1. Becerra afectada por Síndrome Diarreico Neonatal.

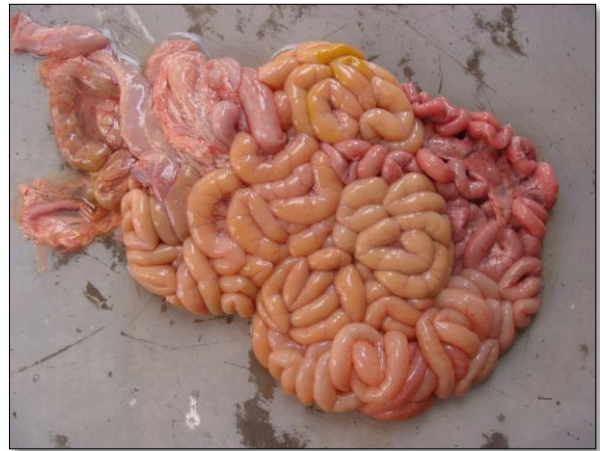


Figura 2. Apariencia macroscópica de las asas intestinales de una becerrá afectada por el SDN.

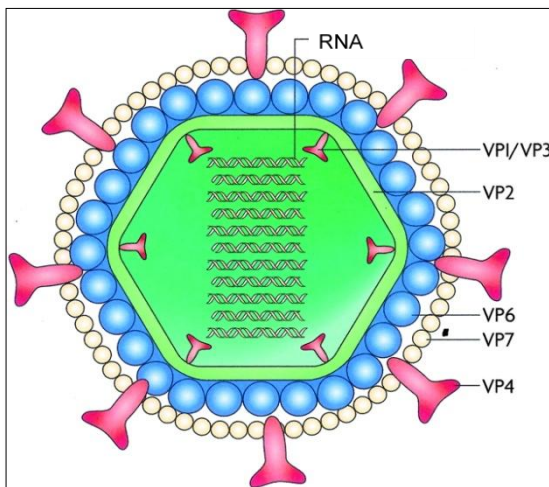


Figura 3. Esquema estructural del rotavirus. (Obtenido de Dennehy, 2008)

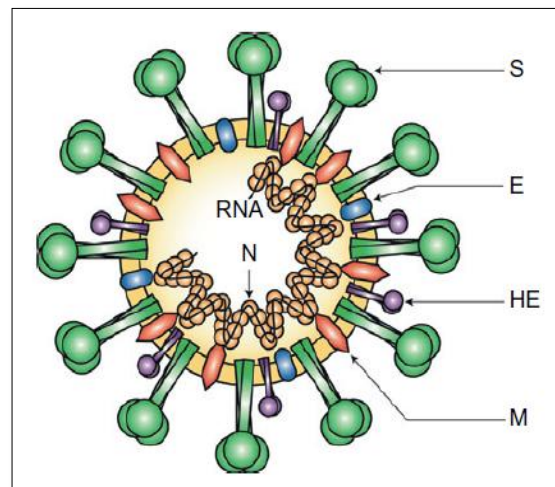


Figura 4. Esquema estructural del coronavirus. (Obtenido de Weiss and Leibowitz, 2011)

Descamación de enterocitos de las vellosidades

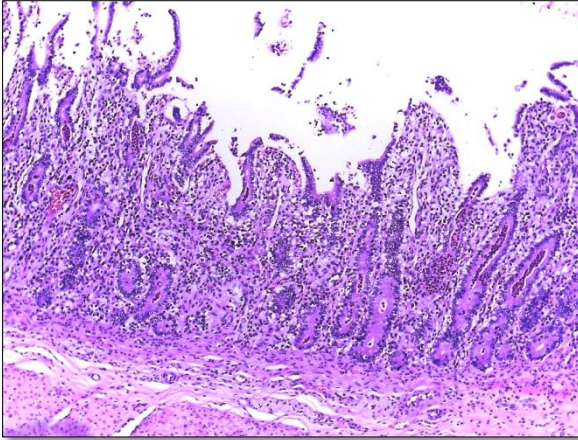


Figura 5. Sección histológica de intestino con descamación leve de enterocitos. HE (10x)

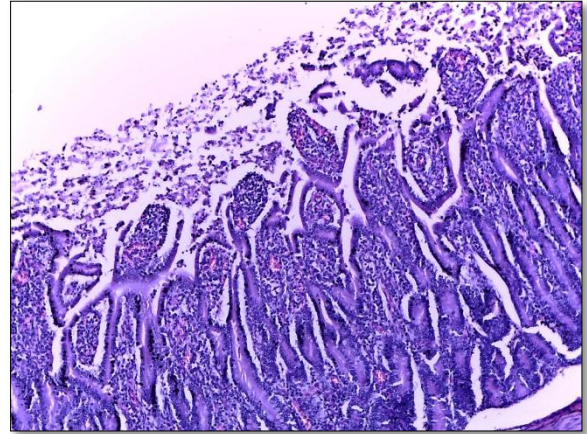


Figura 6. Sección histológica de intestino con descamación moderada de enterocitos. HE (10x)

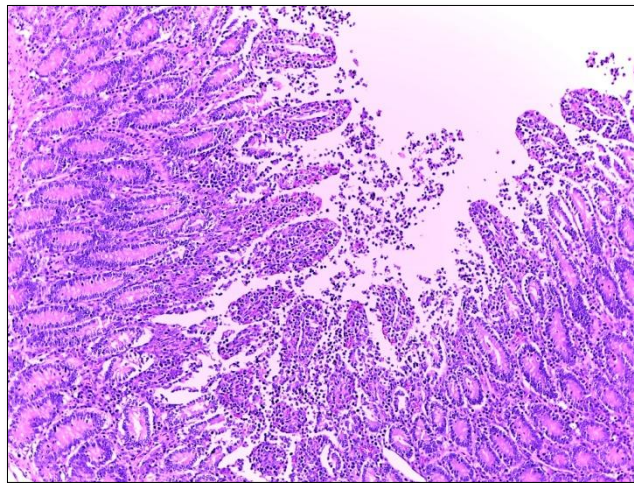


Figura 7. Sección histológica de intestino con descamación severa de enterocitos. HE (10x)

Atrofia de vellosidades

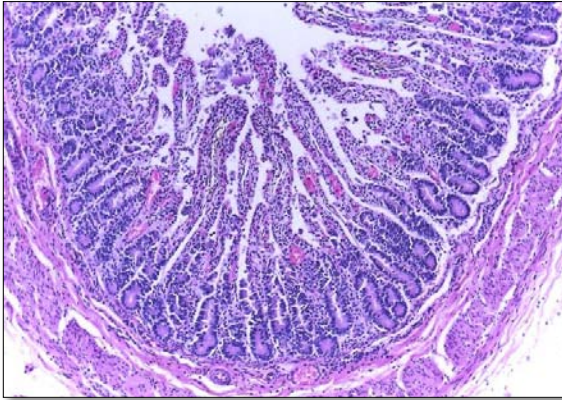


Figura 8. Sección histológica de intestino con atrofia leve de vellosidades. HE (10x)

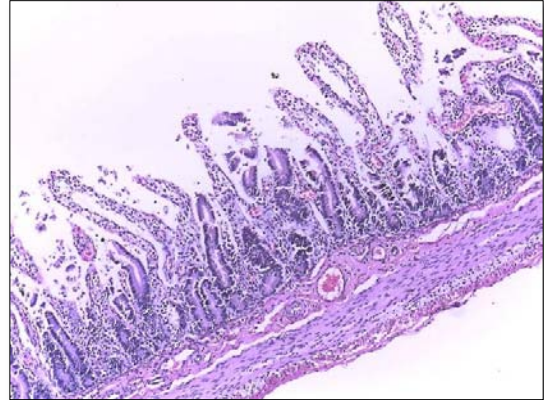


Figura 9. Sección histológica de intestino con atrofia moderada de vellosidades. HE (10x)

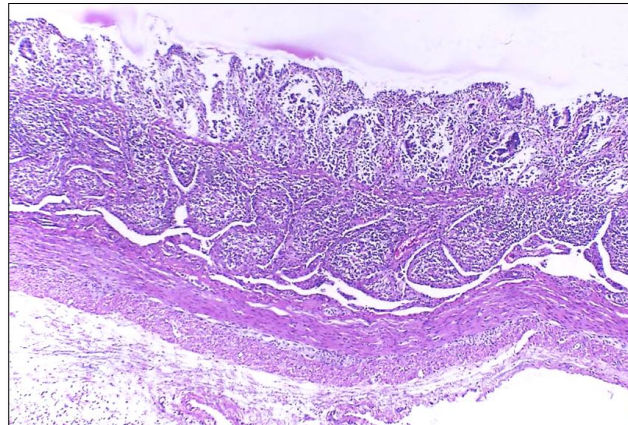


Figura 10. Sección histológica de intestino con atrofia severa de vellosidades. HE (10x)

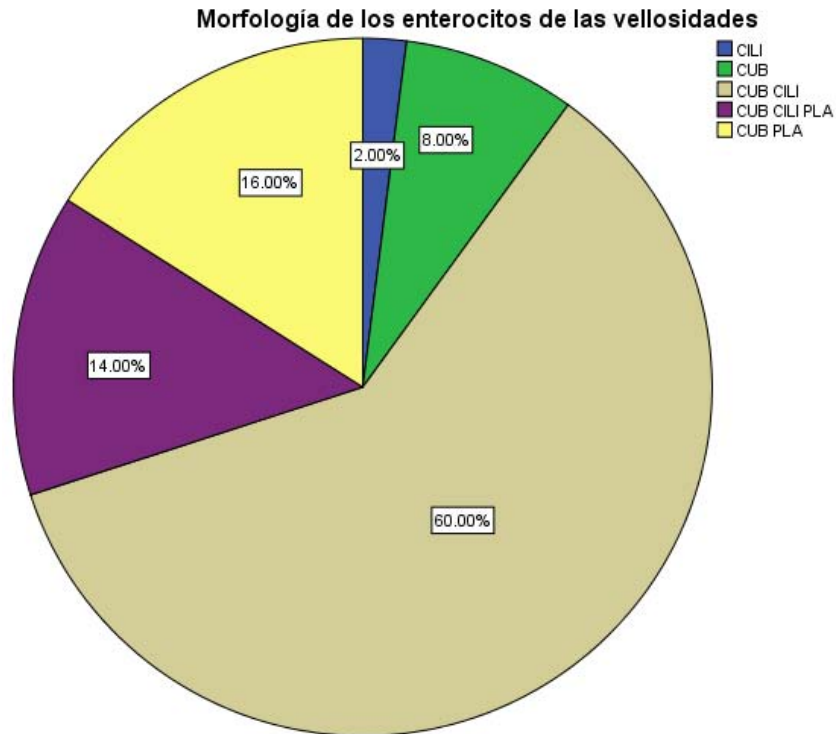


Figura 11. Porcentaje de casos que presentaron cambio en la morfología de los enterocitos de las vellosidades.

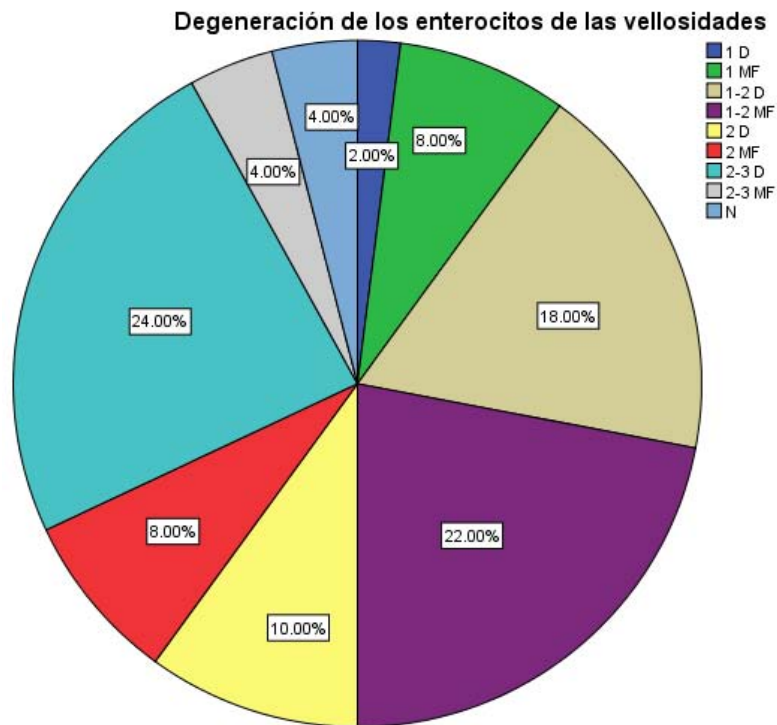


Figura 12. Porcentaje de casos que presentaron degeneración de los enterocitos de las vellosidades (severidad y distribución).

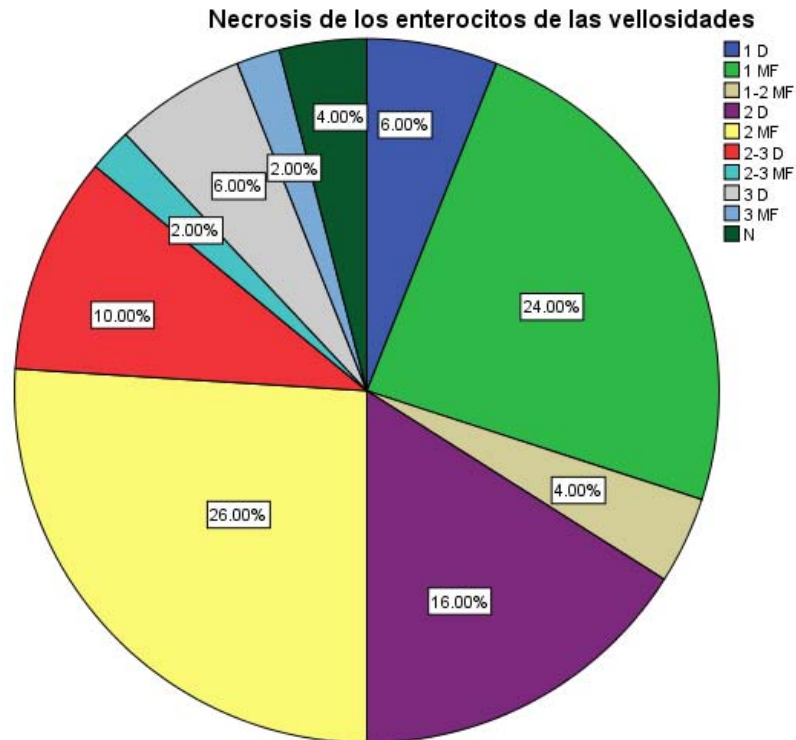


Figura 13. Porcentaje de casos que presentaron necrosis de los enterocitos de las vellosidades (severidad y distribución).

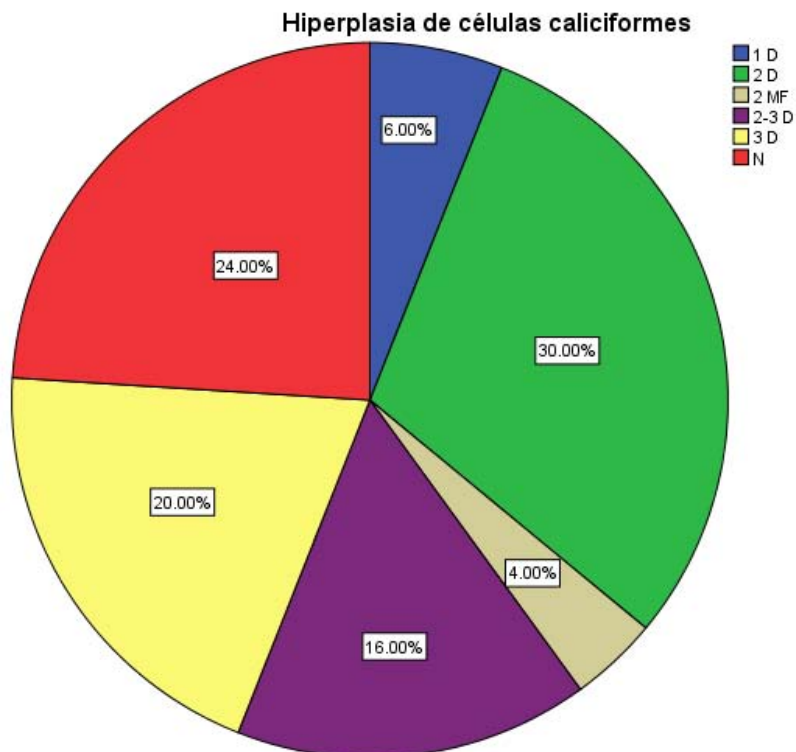


Figura 14. Porcentaje de casos que presentaron hiperplasia de células caliciformes (severidad y distribución).



Figura 15. Porcentaje de casos que presentaron descamación de los enterocitos de las vellosidades (severidad).

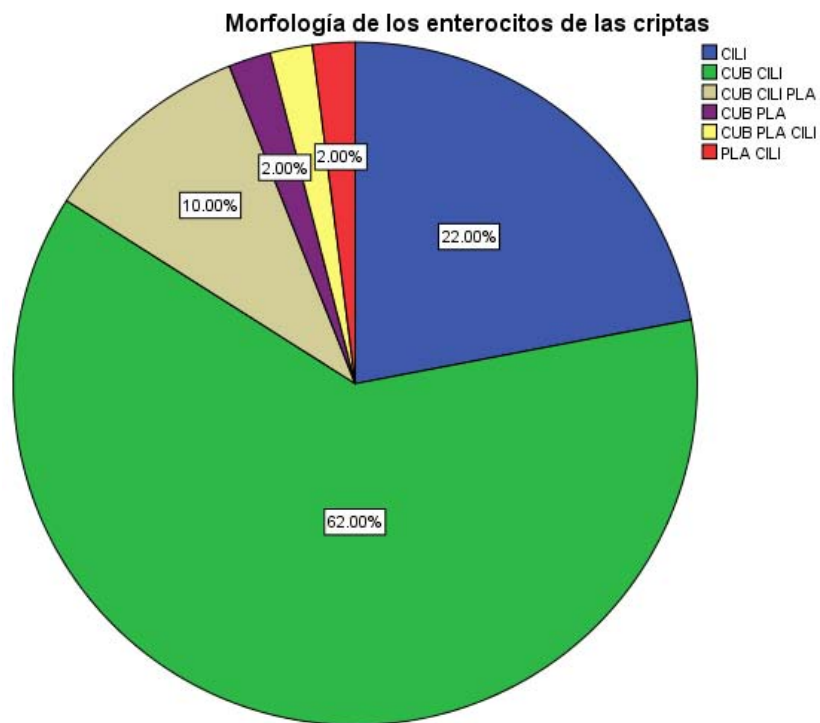


Figura 16. Porcentaje de casos que presentaron cambio en la morfología de los enterocitos de las criptas.

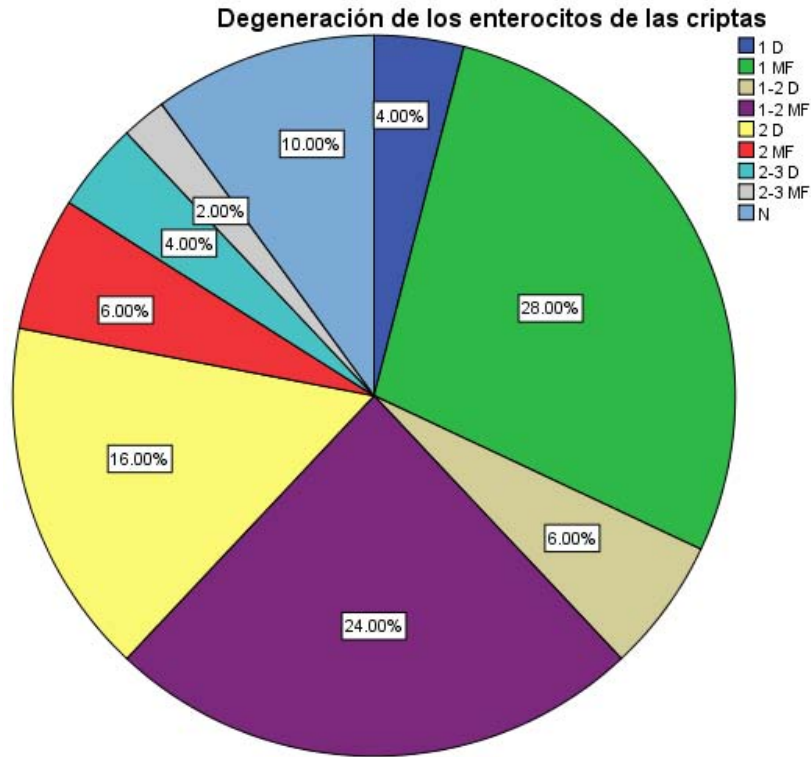


Figura 17. Porcentaje de casos que presentaron degeneración de los enterocitos de las criptas (severidad y distribución).

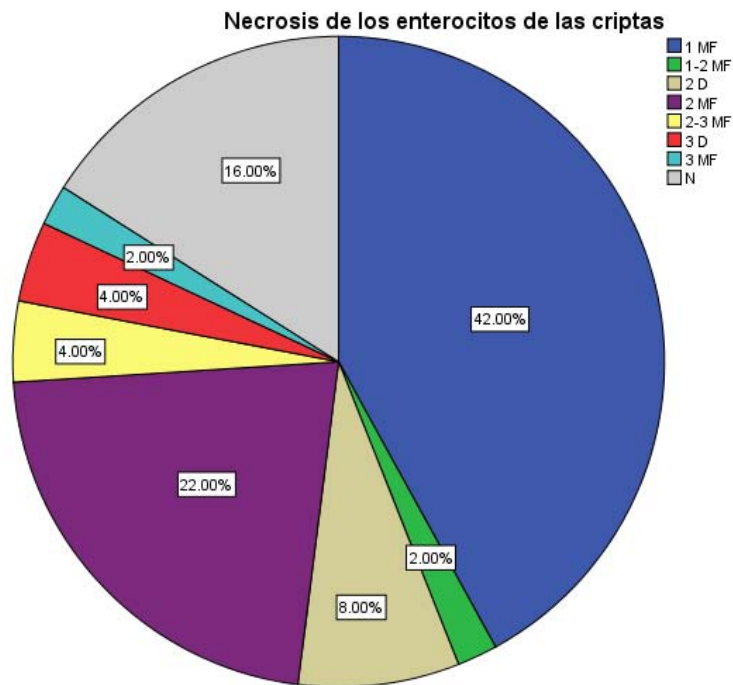


Figura 18. Porcentaje de casos que presentaron necrosis de los enterocitos de las criptas (severidad y distribución).

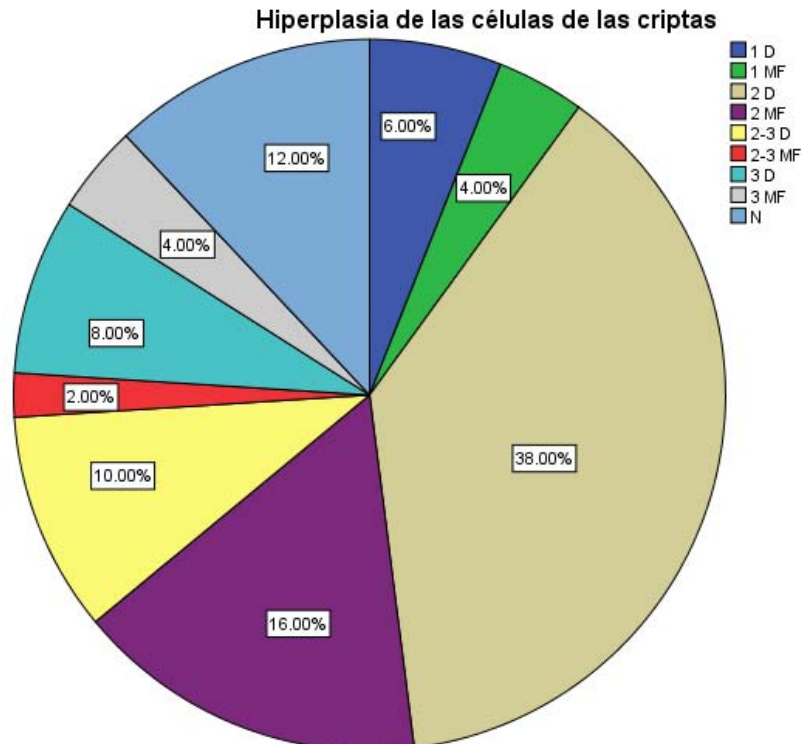


Figura 19. Porcentaje de casos que presentaron hiperplasia de las células de las criptas (severidad y distribución).

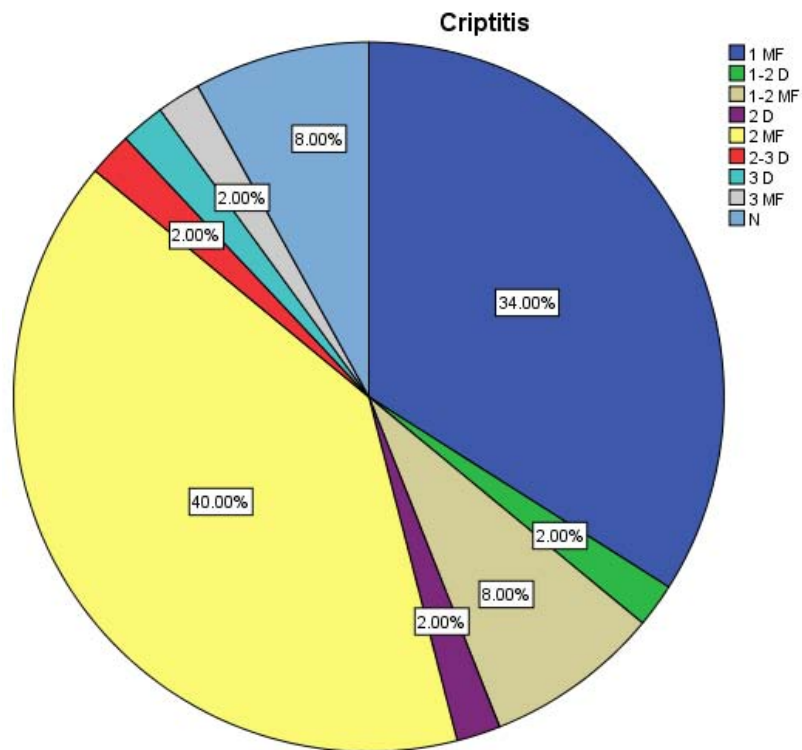


Figura 20. Porcentaje de casos que presentaron criptitis (severidad y distribución).

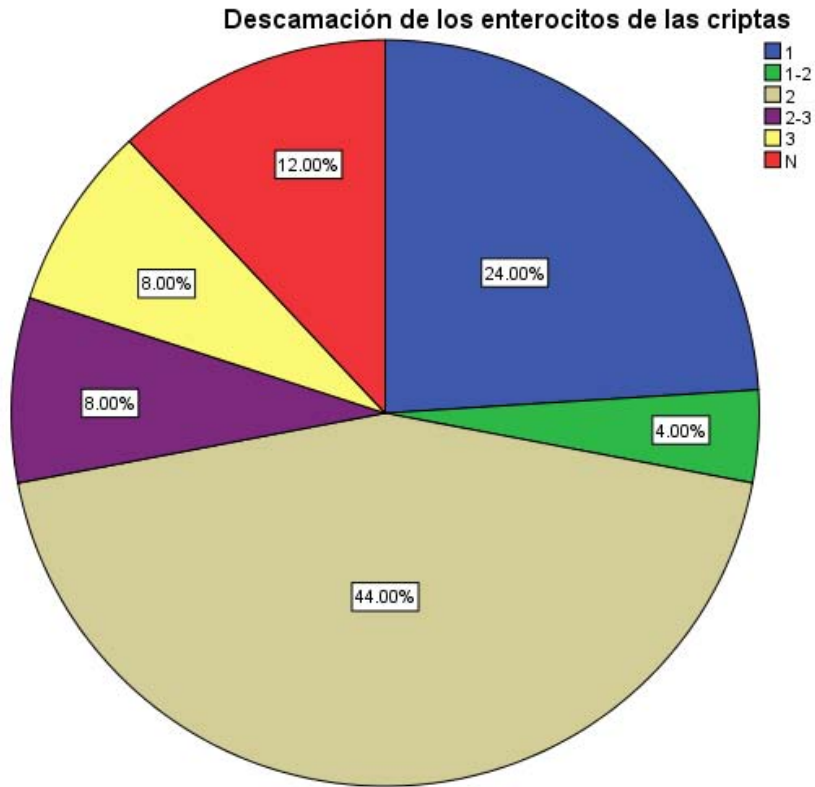


Figura 21. Porcentaje de casos que presentaron descamación de los enterocitos de las criptas (severidad).

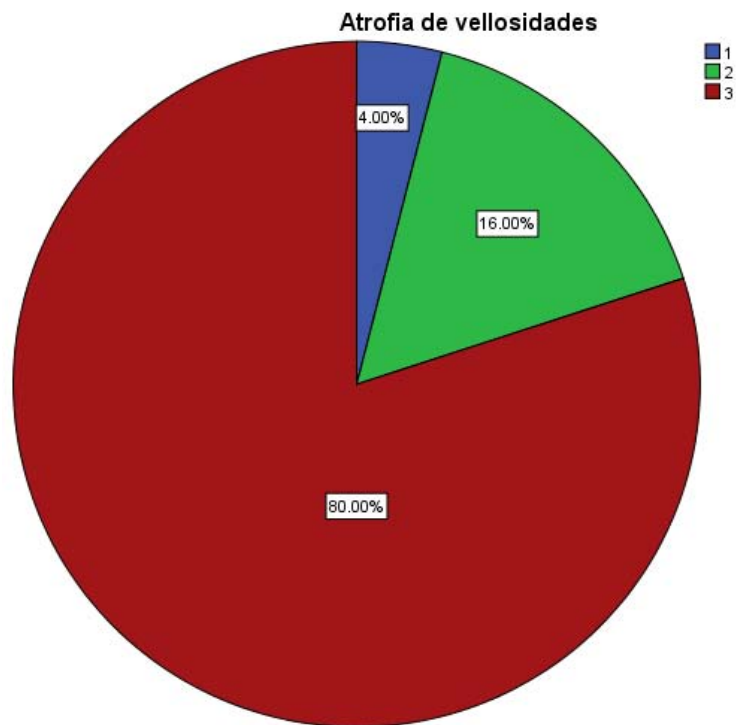


Figura 22. Porcentaje de casos que presentaron atrofia de vellosidades (severidad).

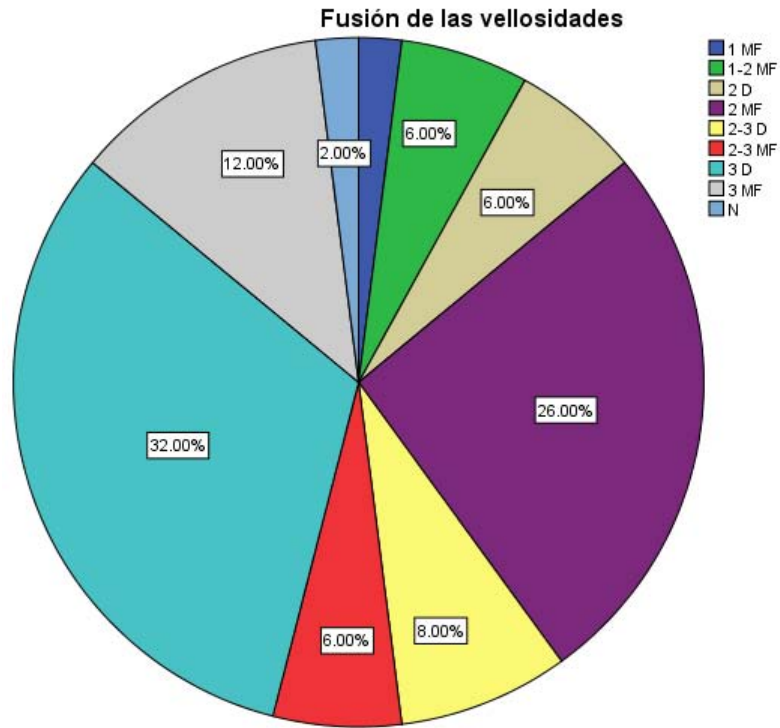


Figura 23. Porcentaje de casos que presentaron fusión de vellosidades (severidad y distribución).

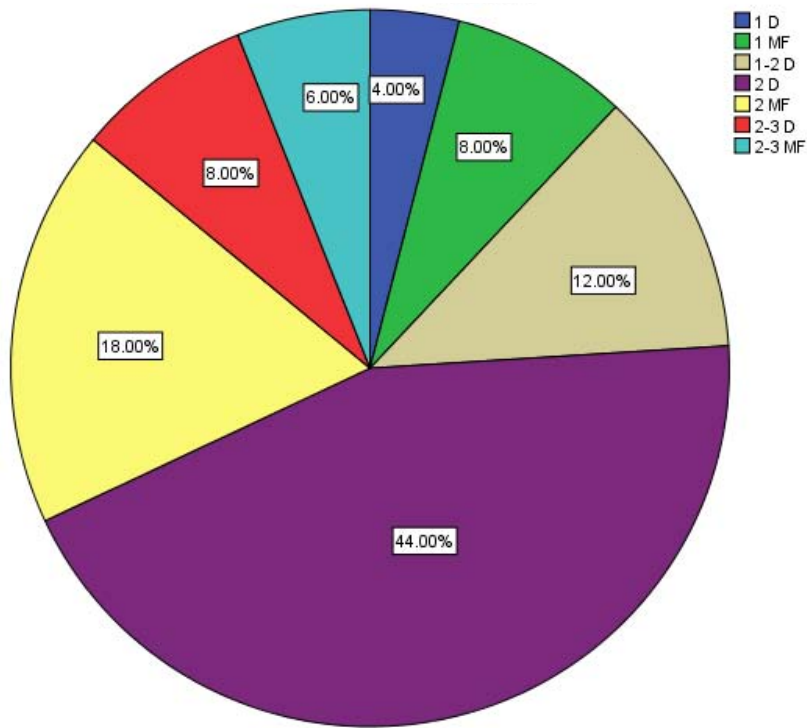


Figura 24. Porcentaje de casos que presentaron enteritis linfoplasmocítica e histiocítica (severidad y distribución).

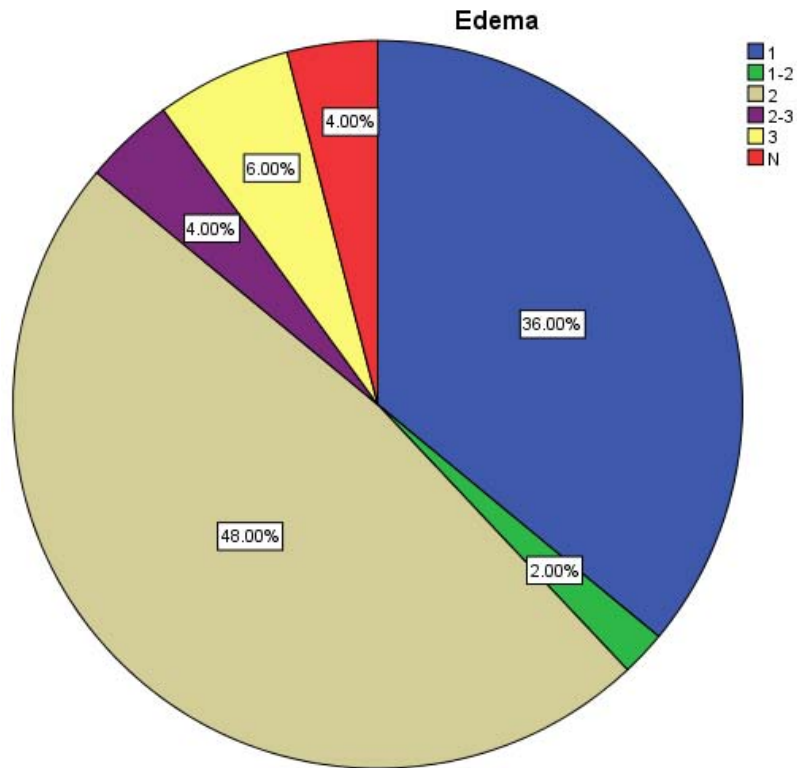


Figura 25. Porcentaje de casos que presentaron edema (severidad).

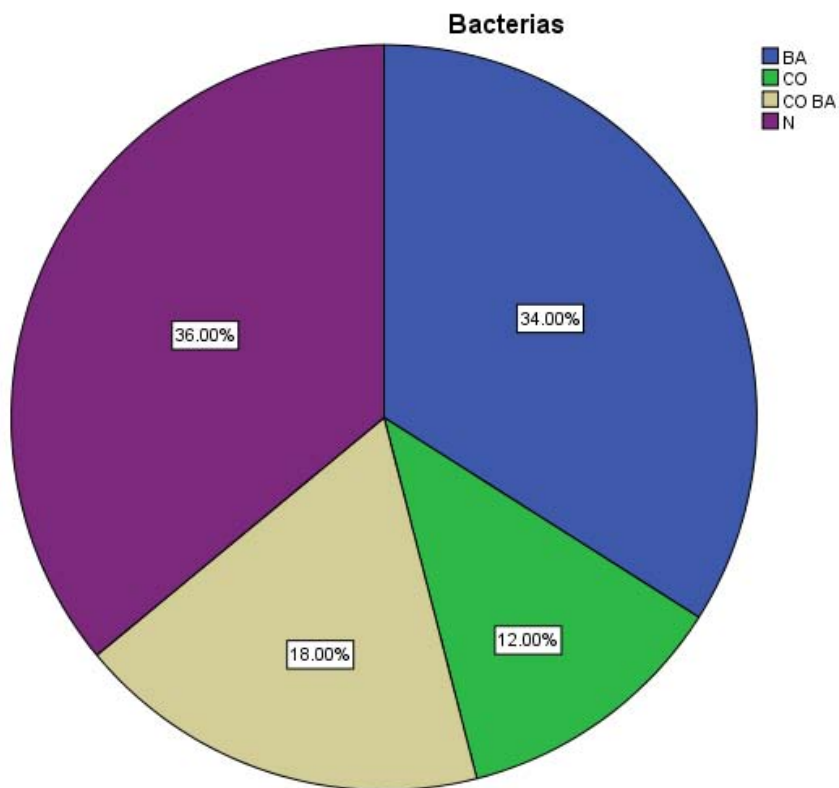


Figura 26. Porcentaje de casos en los que se observaron bacterias.

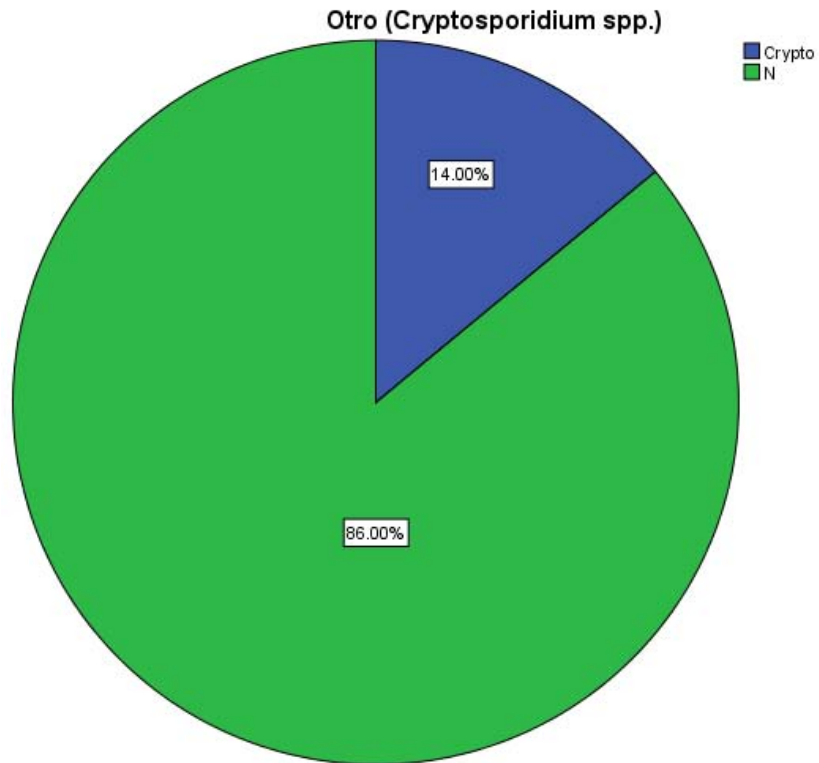


Figura 27. Porcentaje de casos que presentaron *Cryptosporidium* spp.

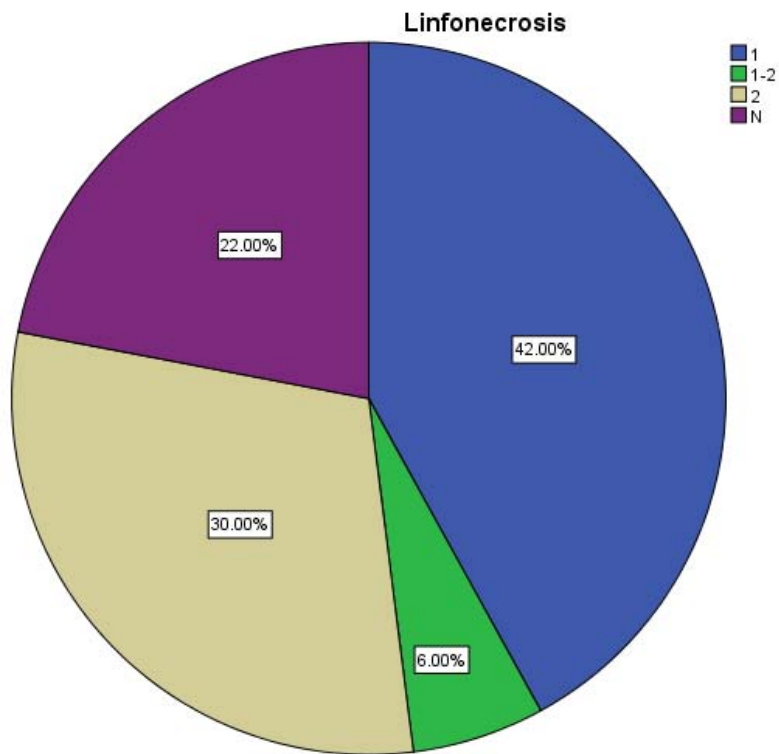


Figura 28. Porcentaje de casos que presentaron linfonecrosis (severidad).

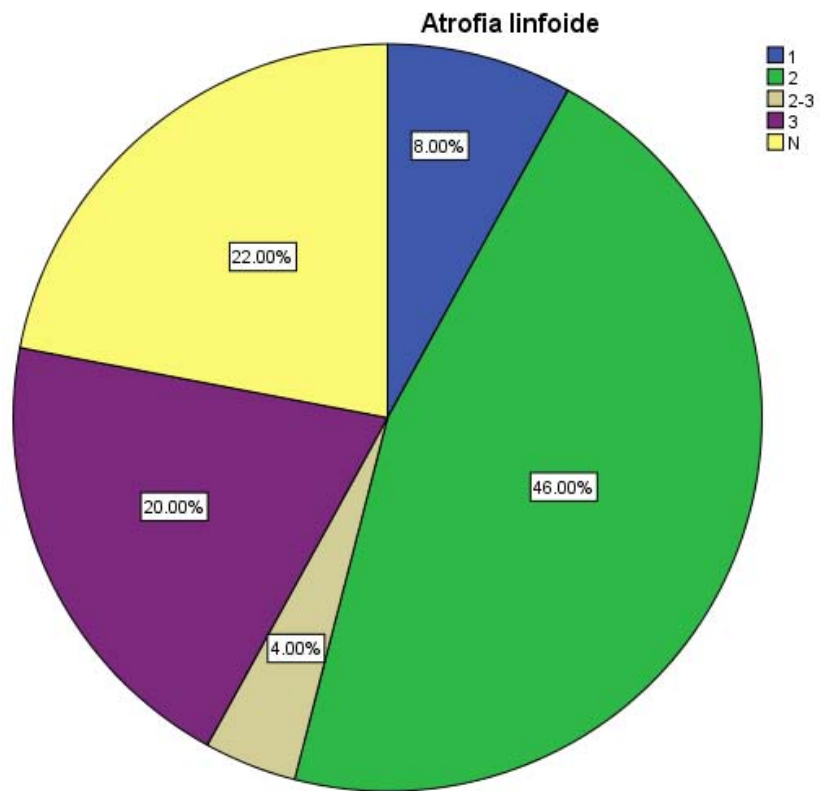


Figura 29. Porcentaje de casos que presentaron atrofia linfoide (severidad).

Inmunopositividad de coronavirus

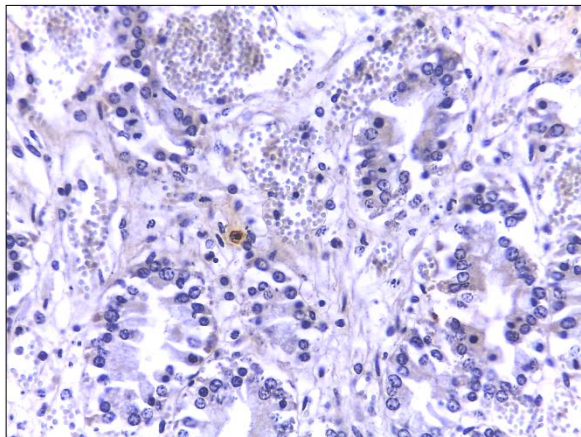


Figura 30. Sección histológica de intestino que exhibe inmunopositividad en macrófago de la lámina propia. Inmunopositividad 1 para coronavirus. Técnica de IHQ (DAB). (40 x)

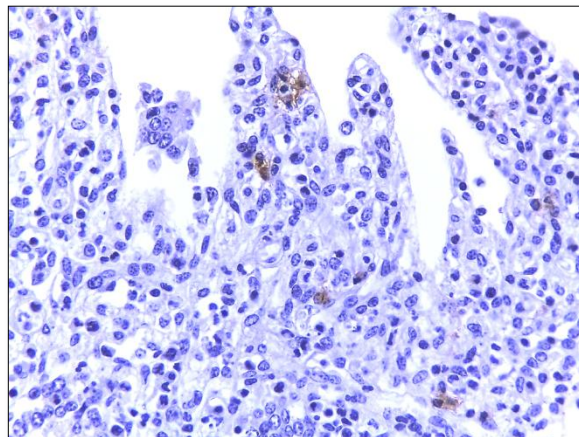
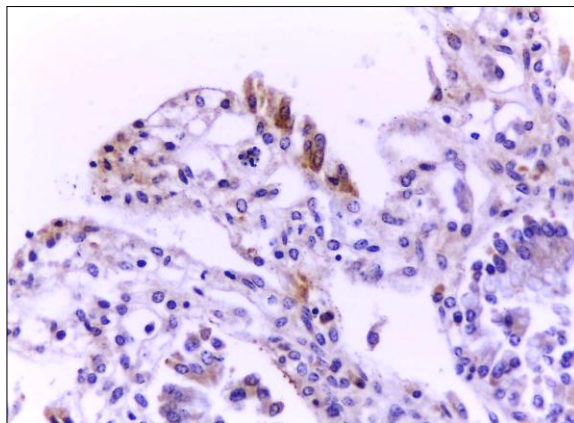
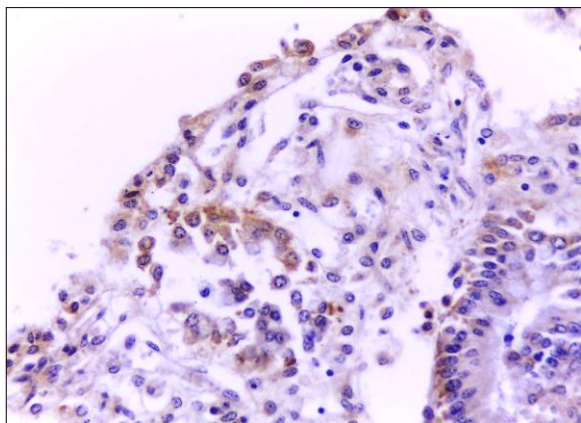


Figura 31. Sección histológica de intestino que exhibe inmunopositividad en macrófagos de la lámina propia. Inmunopositividad 2 para coronavirus. Técnica de IHQ (DAB). (40 x)



Figuras 32 y 33. Secciones histológicas de intestino que exhiben inmunopositividad en células epiteliales y macrófagos de la lámina propia. Inmunopositividad 3 para coronavirus. Técnica de IHQ (DAB). (40 x)

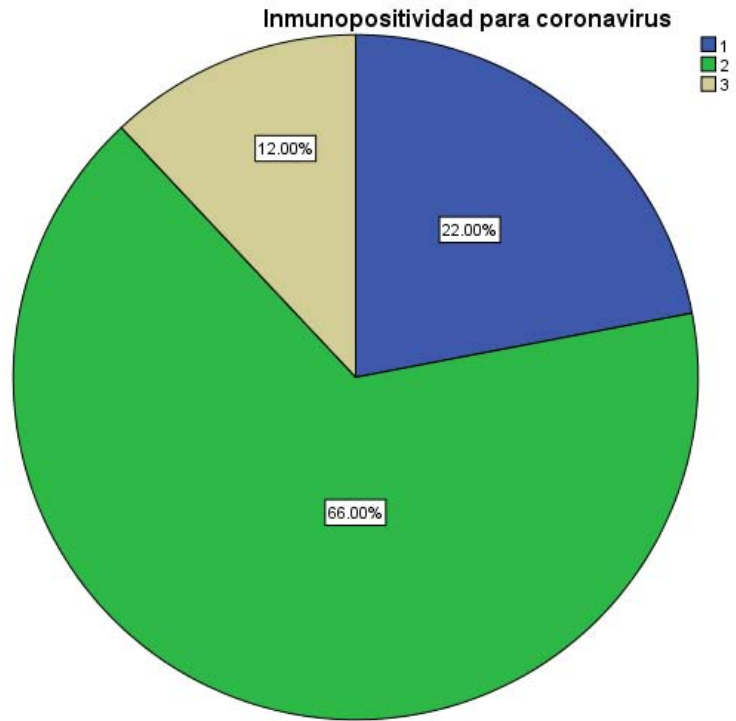


Figura 34. Grado general de inmunopositividad para coronavirus

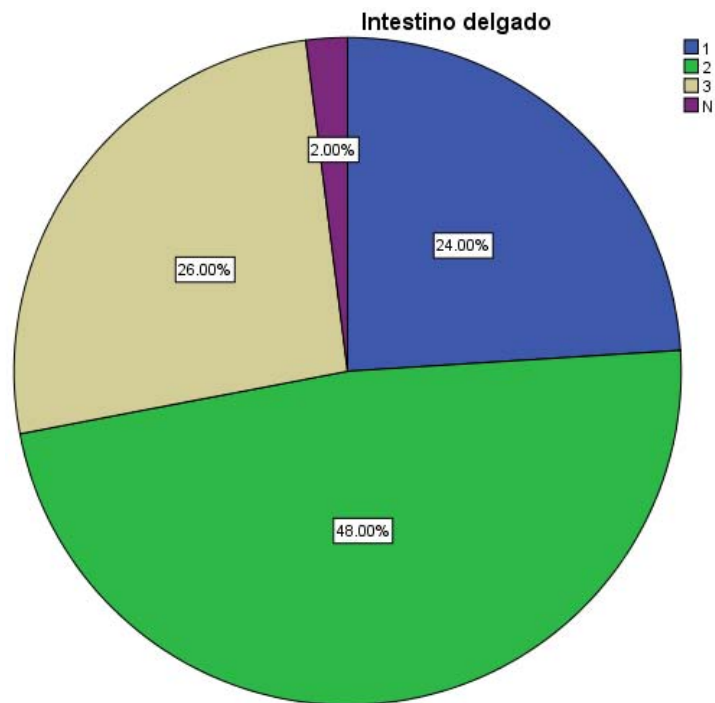


Figura 35. Grado de inmunopositividad observado en intestino delgado para coronavirus

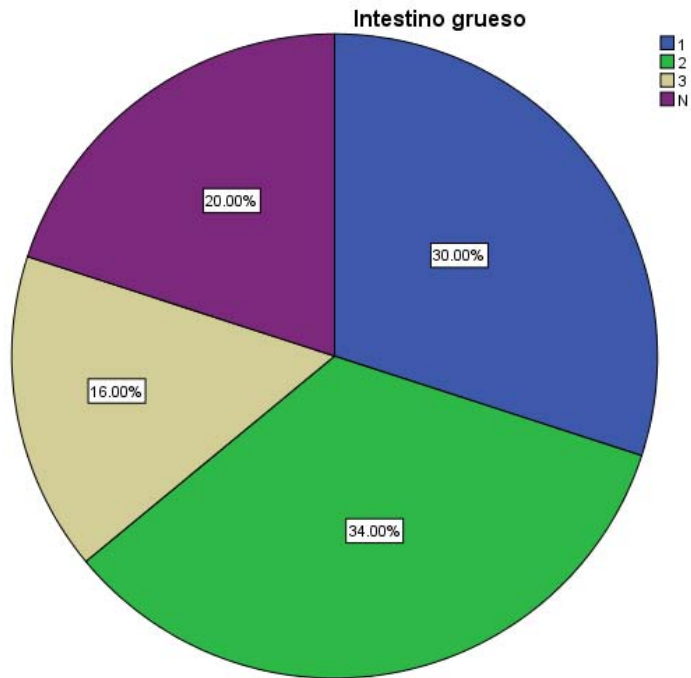


Figura 36. Grado de inmunopositividad observado en intestino grueso para coronavirus

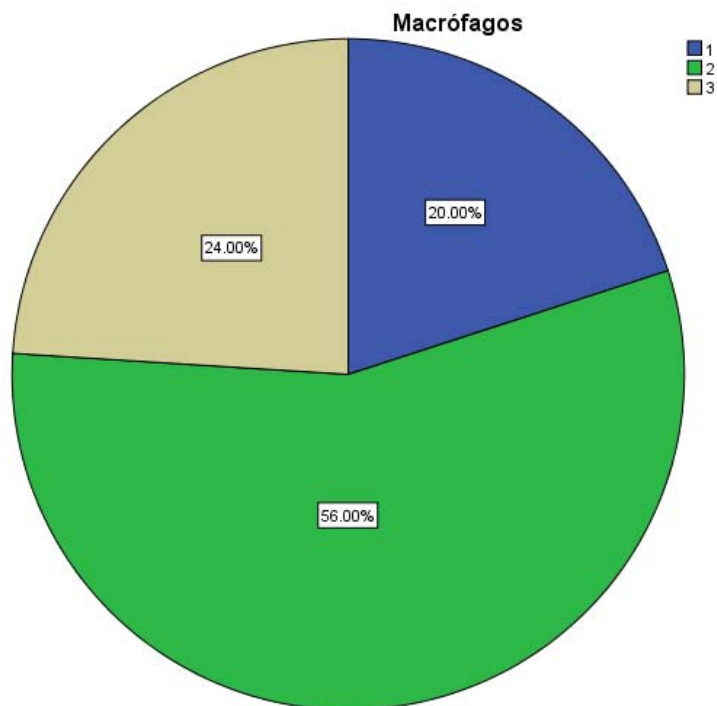


Figura 37. Grado de inmunopositividad observada en macrófagos para coronavirus

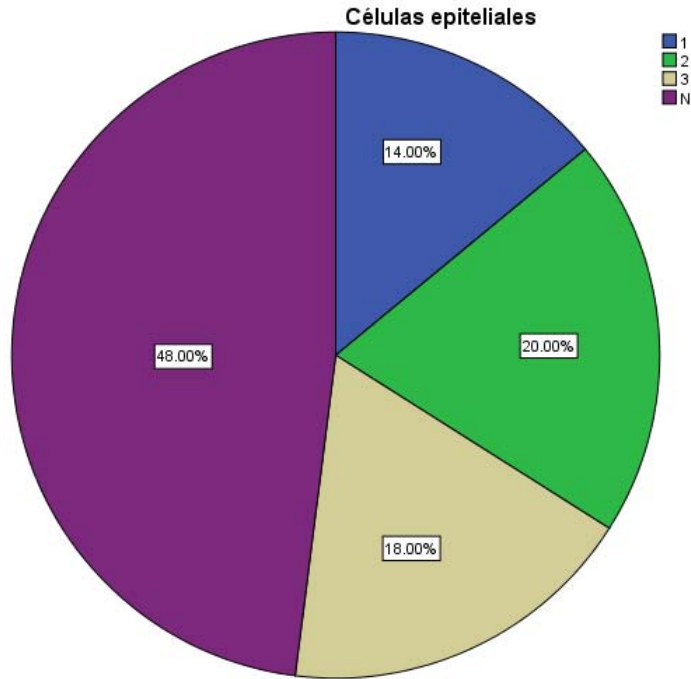


Figura 38. Grado de inmunopositividad observada en células epiteliales para coronavirus

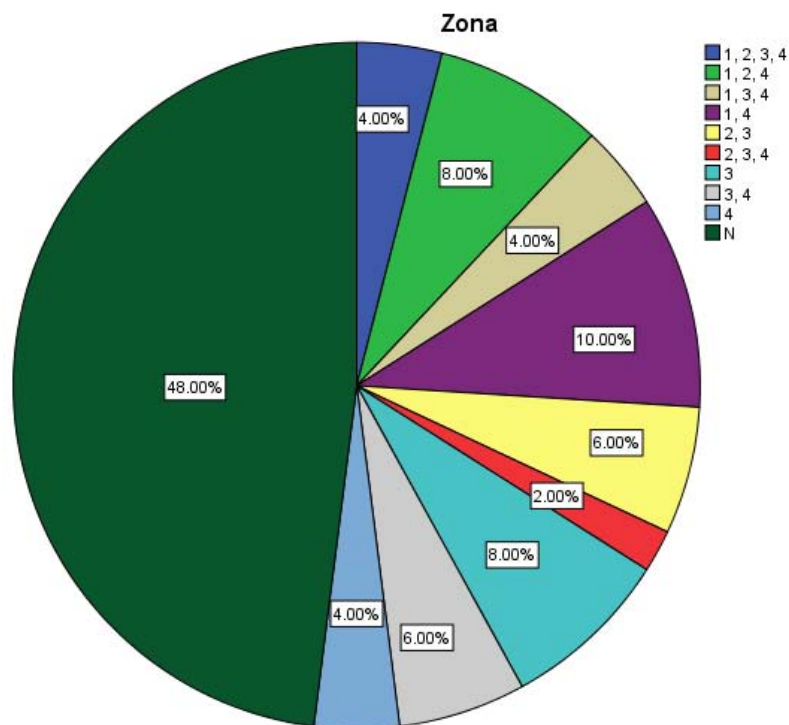


Figura 39. Zonas de las vellosidades que mostraron inmunopositividad para coronavirus. 1/3=1, 2/3=2, 3/3=3, células descamadas=4.

Inmunopositividad de rotavirus

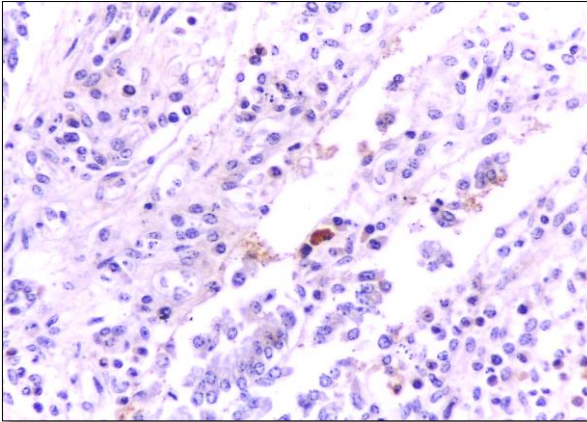


Figura 40. Sección histológica de intestino que exhibe inmunopositividad en macrófago de la lámina propia. Inmunopositividad 1 para rotavirus. Técnica de IHQ (DAB). (40 x)

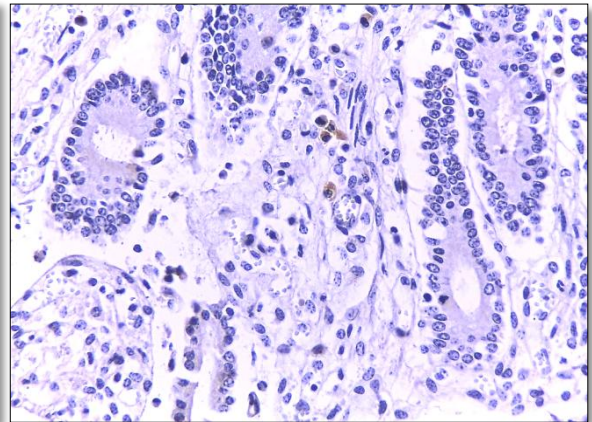
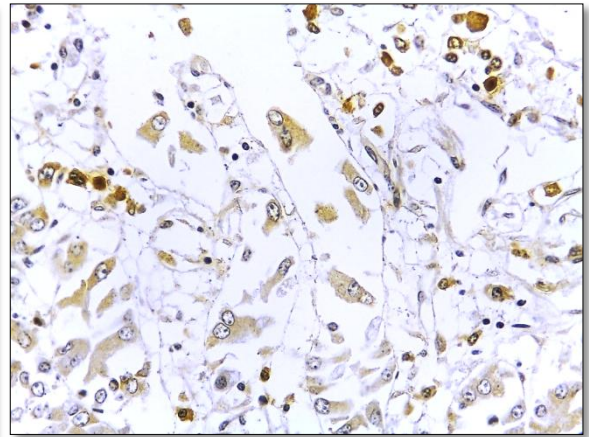
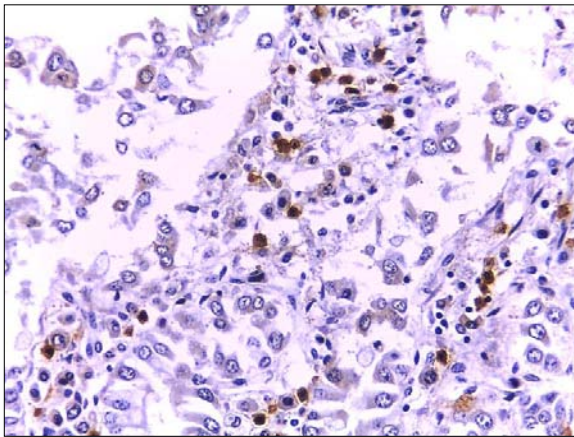


Figura 41. Sección histológica de intestino que exhibe inmunopositividad en macrófagos de la lámina propia. Inmunopositividad 2 para rotavirus. Técnica de IHQ (DAB). (40 x)



Figuras 42 y 43. Secciones histológicas de intestino que exhiben inmunopositividad en células epiteliales y macrófagos de la lámina propia. Inmunopositividad 3 para rotavirus. Técnica de IHQ (DAB). (40 x)

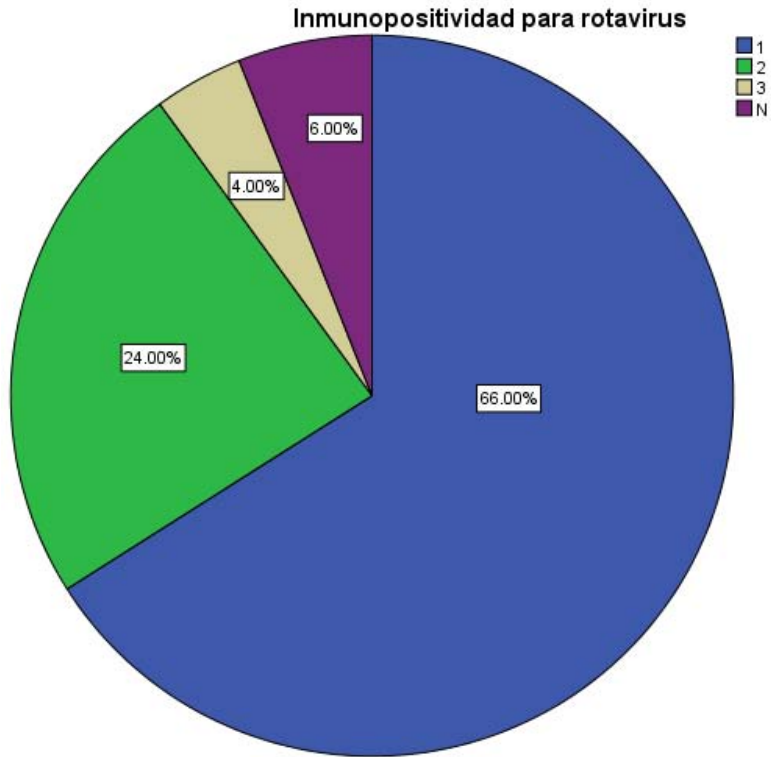


Figura 44. Grado general de inmunopositividad para rotavirus

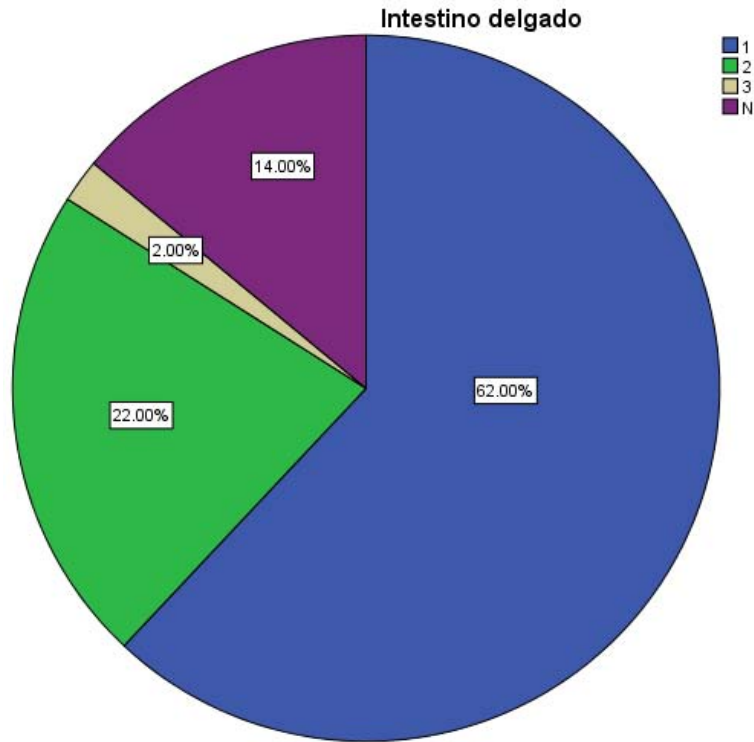


Figura 45. Grado de inmunopositividad observado en intestino delgado para rotavirus

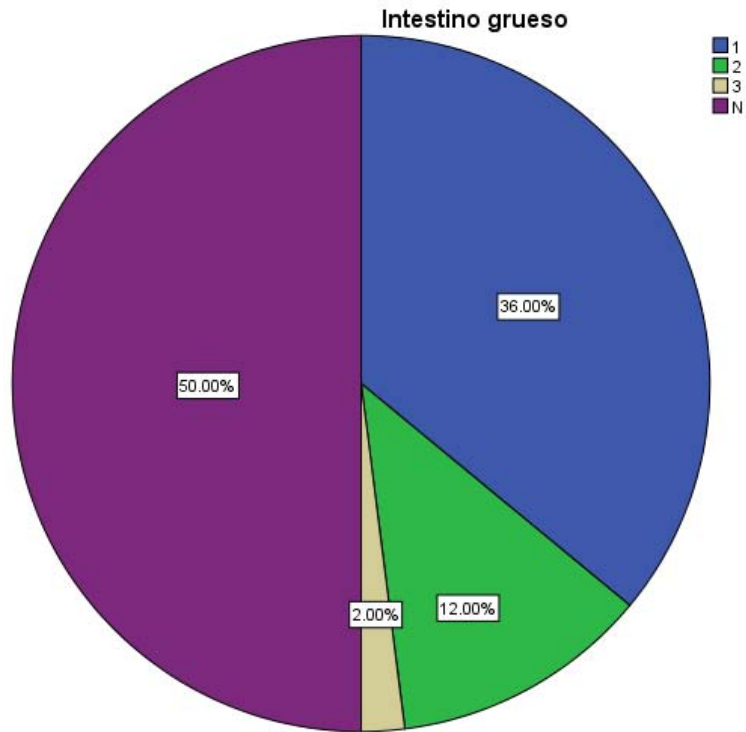


Figura 46. Grado de inmunopositividad observado en intestino grueso para rotavirus

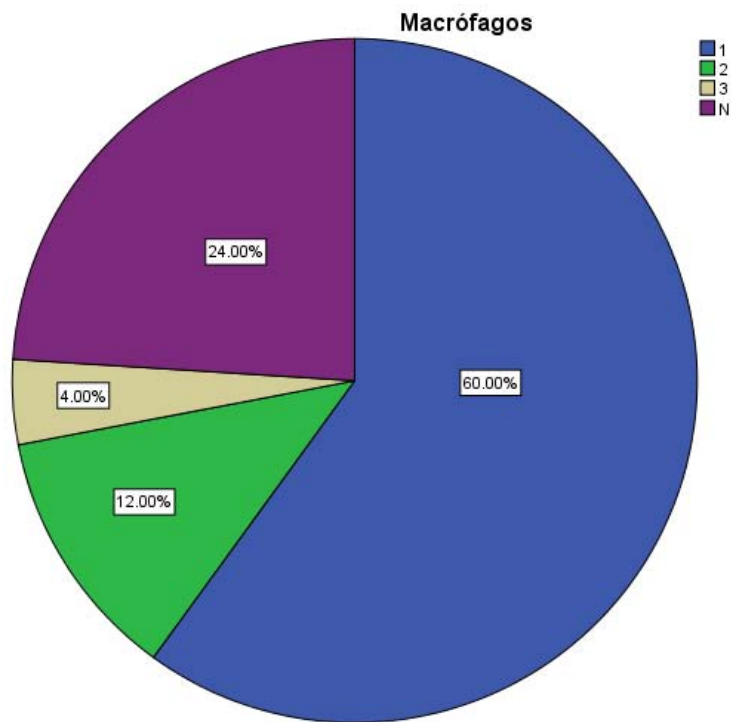


Figura 47. Grado de inmunopositividad observada en macrófagos para rotavirus

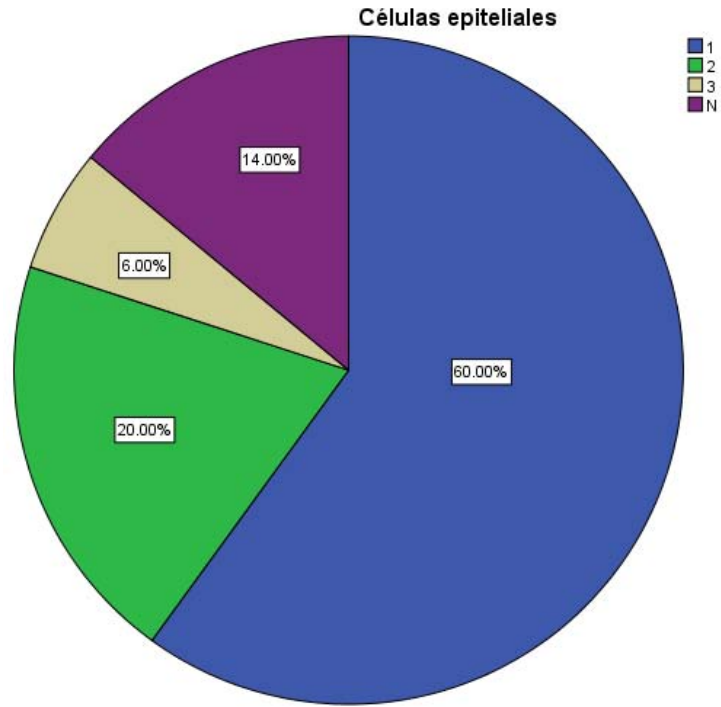


Figura 48. Grado de inmunopositividad observada en células epiteliales para rotavirus

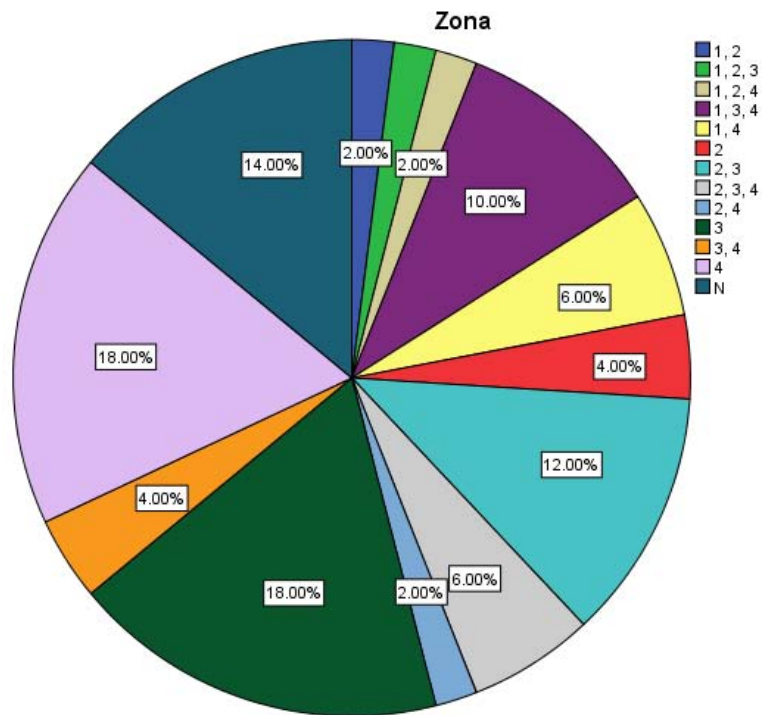


Figura 49. Zonas de las vellosidades que mostraron inmunopositividad para rotavirus. 1/3=1, 2/3=2, 3/3=3, células descamadas=4.

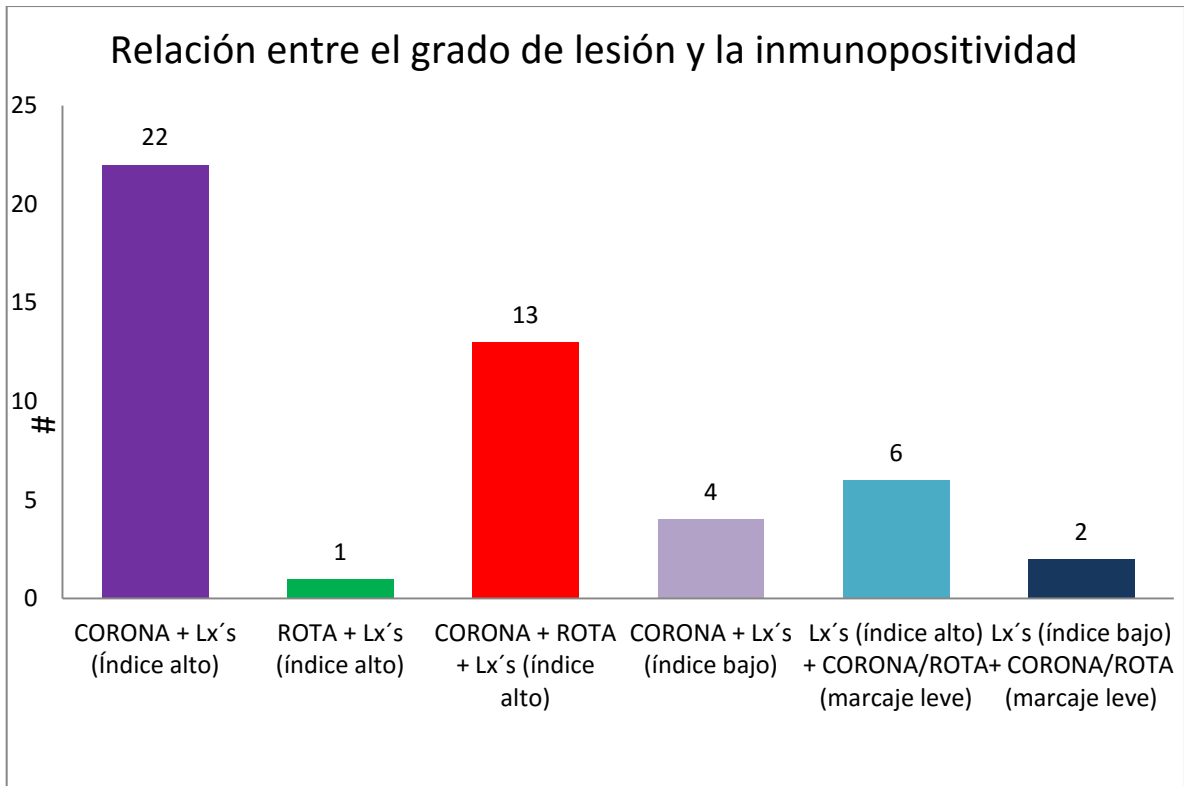


Figura 50. Relación entre el grado de lesión y la inmunopositividad.

CUADROS

#	# Caso	Descamación	Atrofia	SCORE	ROTA	CORONA	Otro	Bacterias
1	T12-051	3	3	6	2	2		CO BA
2	T08-018	3	1	4	1	1	Crypto	BA
3	T08-023	2	2	4	1	1	Crypto	N
4	T08-030	2	3	5	2	1		CO
5	T08-046	2	2	4	1	2		CO BA
6	T08-082	0	3	3	1	1		N
7	T09-026	0	3	3	N	2	Crypto	N
8	T10-005	3	3	6	1	1		N
9	T10-06	2	2	4	2	2	Crypto	N
10	T10-023	3	3	6	2	2		N
11	T10-025	2	2	4	2	2		CO
12	T11-014	2	3	5	1	2		N
13	T11-058	3	3	6	3	2		CO
14	T12-004	3	3	6	1	2		N
15	T12-026	3	3	6	1	1		CO BA
16	T12-027	3	3	6	1	1		CO
17	T12-031	2	3	5	2	2		BA
18	T12-032	3	3	6	1	1		BA
19	T12-033	2	3	5	2	2	Crypto	BA
20	T12-035	3	3	6	1	2		N
21	T12-036	3	3	6	1	2		CO BA
22	T12-037	3	2	5	1	2		BA
23	T12-039	2	3	5	1	1		N
24	T12-040	2	3	5	1	2		N
25	T10-026	3	3	6	2	2		N
26	T10-039	1	3	4	1	2		N
27	T10-051	3	3	6	2	2		N
28	T10-052	3	3	6	1	2	Crypto	CO
29	T12-053	3	3	6	1	2		BA
30	T12-057	3	3	6	1	2	Crypto	BA
31	T12-065	3	3	6	1	2		BA
32	T12-066	3	3	6	1	2		BA
33	T12-067	2	3	5	1	3		BA
34	T12-075	3	3	6	1	2		CO BA
35	T12-076	3	3	6	1	1		CO
36	T12-081	3	3	6	1	2		N
37	T12-082	3	1	4	1	3		CO BA
38	T12-091	3	3	6	2	3		BA

#	# Caso	Descamación	Atrofia	SCORE	ROTA	CORONA	Otro	Bacterias
39	T12-093	3	2	5	1	2		N
40	T12-097	3	2	5	3	2		BA
41	T12-100	3	3	6	N	1		BA
42	T12-103	3	3	6	2	2		N
43	T12-111	3	2	5	2	3		BA
44	T12-131	3	3	6	1	2		CO BA
45	T12-132	2	3	5	1	2		BA
46	T12-138	2	3	5	1	3		CO BA
47	T12-144	3	3	6	1	2		BA
48	T12-146	2	3	5	1	3		CO BA
49	T12-147	3	3	6	N	2		N
50	T12-153	3	3	6	1	2		BA

Cuadro 1. Relación entre el grado de lesión (Score) con la positividad mostrada en inmunohistoquímica.