



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

IDENTIFICACIÓN DE PARVOVIRUS, ROTAVIRUS Y
CORONAVIRUS EN PERROS CON GASTROENTERITIS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

PRESENTA

MVZ. ARIADNA FLORES ORTEGA

Toluca, México, Febrero 2015.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

IDENTIFICACIÓN DE PARVOVIRUS, ROTAVIRUS Y
CORONAVIRUS EN PERROS CON GASTROENTERITIS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

P R E S E N T A

MVZ. ARIADNA FLORES ORTEGA

COMITÉ TUTORIAL:

DR. JOSÉ SIMÓN MARTÍNEZ CASTAÑEDA

ACADÉMICO

DRA. LINDA GUILIANA BAUTISTA GÓMEZ

ADJUNTO

DRA. MONICA DE NOVA OCAMPO

Toluca, México, Febrero 2015

Índice

I. Dedicatoria	1
II. Agradecimientos.....	2
III. Resumen.....	4
IV. Abstrac.....	6
V. Introducción general.....	8
1. Parvovirus canino.....	11
1.1 Etiología.....	11
1.2 Taxonomía.....	12
1. 3 Morfología del virus	12
1. 4 Propiedades del virión	13
1. 5 Genoma viral	14
1. 6 Replicación viral	16
1. 7 Epidemiología.....	17
1. 8 Patogenia	19
1. 9 Semiología.....	21
2. Coronavirus.....	23
2.1 Etiología.....	23
2. 2 Taxonomía.....	23
2. 3 Morfología del virus	24
2. 4 Propiedades del virión	25
2. 5 Genoma viral	26
2. 6 Replicación viral	26
2. 7 Epidemiología.....	27
2. 8 Patogenia	29
2. 9 Semiología.....	30
2.10 Lesiones histopatológicas.....	31
3. Rotavirus.....	32
3. 1 Etiología.....	32

3. 2 Taxonomía.....	33
3.3 Morfología del virus	33
3. 4 Propiedades del virión	34
3. 5 Genoma viral	35
3. 6 Replicación viral	36
3. 7 Epidemiología.....	39
3. 8 Patogenia	40
3. 9 Semiología.....	41
3.10 Lesiones histopatológicas.....	41
4. Asociaciones de algunos patógenos con PVC-2 en gastroenteritis.....	42
5. Técnicas de Diagnóstico (parvovirus, coronavirus, rotavirus).....	43
6. Justificación	45
7. Hipótesis	45
8. Objetivos.....	45
8.1 General.....	45
8.2 Específicos	45
9. Material y métodos.....	46
9.1 Colecta de muestras biológicas.....	46
9.2 Diagnóstico clínico.....	47
9.3 Extracción de DNA	48
9.4 Amplificación de PCR simple.....	49
9.5 Extracción de RNA	50
9.6 Amplificación de RT-PCR.....	51
10. Coronavirus canino (ELISA)	54
11. Salmonella ssp.	55
12. Resultados.....	57
12.1 PCR simple (Parvovirus)	58
12.2 RT-PCR (Rotavirus)	59
12.3 Secuenciación	60
12.4 ELISA	61

13. Artículo enviado	65
14. Discusión general	1
15. Conclusión	2
16. Referencias.....	4
Anexo 1.....	8

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación jerárquica de parvovirus canino	12
Tabla 2. Clasificación jerárquica de coronavirus canino	23
Tabla 3. Propiedades del virion.....	25
Tabla 4. Clasificación jerárquica de rotavirus canino	33
Tabla 5. Primers para parvovirus canino	49
Tabla 6. Reactivos para PCR	49
Tabla 7. Primers rotavirus canino	52
Tabla 8. Reactivos RT-PCR	52
Tabla 9. Titulación de anticuerpos.....	62
Tabla 10. Signología clínica rotavirus, parvovirus y asociaciones	64

Índice de figuras

Figura 1. Modelo de la superficie de la cápside de CPV-2.....	13
Figura 2. La estructura genética del genoma de CPV. ADN genómico de parvovirus canino y su estrategia de transcripción	15
Figura 3. Comprensión actual de la evolución CPV	18
Figura 4. Esquema del virión de coronavirus canino, con el conjunto de sus proteínas estructurales.....	24
Figura 5. Genoma del coronavirus canino, sus diferentes variantes	26
Figura 6. Ciclo replicativo	27
Figura 7. Representación esquemática de un rotavirus.....	34
Figura 8. Esquema de genoma segmentado de rotavirus canino.....	36
Figura 9. Ciclo replicativo de rotavirus canino	37
Figura 10. Gel de agarosa 2X PCR simple	58
Figura 11. Gel de agarosa 1.5X RT-PCR.....	59
Figura 12. Secuenciación.....	60

Índice de gráficas

Gráfica 1 resultados de la ELISA INDIRECTA.....	61
Gráfica 2 Resultados de panel gastroenterico	62
Gráfica 5 Presencia de virus.....	63
Gráfica 6 Signos clínicos de perros infectados con parvovirus, rotavirus y co- infección parvo-rota.	64

I. Dedicatoria

A las personas que me cuidan desde el cielo y que iluminan mi vida con su luz.

A Pablo Flores Del Rosario, mi padre, la persona que más admiro en este mundo, porque sin su ejemplo y apoyo esto no sería posible.

A mi madre, Amelia Ortega Calvillo, gracias por tu ayuda moral, tus consejos, porque siempre quiero ser tu motivo de orgullo.

A Jenny Flores, mi hermana, te amo con todo mi corazón, tú siempre serás mi ejemplo de fortaleza, y un día espero ser académicamente tan grande como tú.

A mi hermanita, Anabel Flores Ortega, también eres parte de este logro y te agradezco tu apoyo, te amo pequeña!

II. Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su sustento mediante la beca de apoyo a estudiantes de posgrado, para poder realizar mis estudios de maestría y llevarlos a su término.

A la Universidad Autónoma del Estado de México, por el apoyo económico al proyecto de investigación y al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por brindarme la oportunidad de poder desarrollar mi trabajo de laboratorio en sus instalaciones.

Al Dr. José Simón Martínez Castañeda, por darme la valiosa oportunidad de adquirir experiencias y conocimientos por medio de sus enseñanzas y disciplina, en el aula y laboratorio, por mostrarme otra perspectiva de la vida académica.

A la Dra. Linda Guiliana Bautista Gómez por su apoyo incondicional en todo momento.

A la Mtra. Mirna Faz, por todo su apoyo, sus enseñanzas, por ser una gran maestra, por darme valiosas herramientas para el laboratorio y en la parte clínica, gracias por brindarme tu confianza y amistad.

Al Mtro. José Antonino Zepeda por brindarme tiempo y apoyo en laboratorio

A la Bióloga María Dolores Laucel Ochoa García por su apoyo en la realización de la ELISA.

Al Dr. Israel Alejandro Quijano Hernández, gracias por su tiempo y ayuda en la recopilación de muestras en el HVPE. También agradezco a todos los pacientes que forman parte de este estudio.

III. Resumen

Las gastroenteritis infecciosas son una causa común de consultas veterinarias, pueden ser causadas por diversos patógenos; virus, bacterias, parásitos o la combinación de estos (Gizzi, 2014), sin embargo solo parvovirus canino tipo 2 (PVC-2) se ha posicionado como el patógeno principal que se diagnostica con mayor frecuencia en los problemas gastroentéricos, existen diversos factores de importancia para la variabilidad de los cuadros clínicos de parvovirus canino, se ha mencionado que uno de estos factores es la asociación con otros virus gastroentéricos, como coronavirus canino y rotavirus canino (Rimmelzwaan, 1991).

En la parte 1 del trabajo se realizó un tamiz para determinar si algunos de los virus gastroentéricos presentes en otras partes del mundo se encontraban circulantes en pacientes con cuadros gastroentéricos asociados a parvovirus. Se tomaron 29 pacientes caninos con algunos criterios de inclusión (material y métodos) de los cuales se obtuvieron los siguientes resultados: de 29 perros, 11 fueron positivos a parvovirus canino por el método de PCR simple, 9 fueron positivos a rotavirus canino por el método de RT-PCR, 6 fueron reactivos a coronavirus canino por el método de ELISA indirecta. 1 perro presento *salmonella ssp.* 2 fueron negativos a parvovirus, coronavirus, rotavirus, presentaban cuadro gastroentérico y fueron positivos a distemper canino. Parvovirus y rotavirus fueron los patógenos más comunes en esta población canina. Por lo tanto, para la segunda parte del trabajo, solo se realizó el diagnóstico de parvovirus y coronavirus, para analizar el

comportamiento de algunos signos clínicos de los pacientes en infecciones por un solo virus o en co- infección.

En la parte 2 de la investigación se hizo el diagnóstico a 50 perros, solamente para parvovirus y rotavirus, debido a que fueron los patógenos que se encontraron con mayor presencia en la parte de este estudio. Los resultados arrojados fueron los siguientes: De los 50 perros, 82% (45/50) fueron positivas para al menos uno de los dos virus, específicamente, 60% (27/45) fueron positivas solamente para parvovirus, 8% (7/45) fueron positivas sólo para el rotavirus y el 14% (11/45) fueron co-infectados. Cinco muestras no fueron positivas, ya sea para el parvovirus o rotavirus. Los signos clínicos de rotavirus fueron menos severos que las de parvovirus; perros infectados con rotavirus exclusivamente, muestran dolor abdominal, letargo, vómito, diarrea mucoide y en algunos casos leucocitosis. Sin embargo, en los perros coinfectados observamos síntomas gastrointestinales graves, además de la leucopenia, la panleucopenia, diarrea mucoide o hemorrágico, vómitos y letargo. En este estudio reportamos por primera vez que rotavirus canino se encuentra circulando entre la población de perros de una región de México, se observó asociado con el patógeno más frecuente que es parvovirus pero también se encontró en otras asociaciones mixtas con coronavirus. Cumpliendo nuestra hipótesis inicial que decía que en perros del Estado de México se encuentran circulando rotavirus y coronavirus en asociación con parvovirus, produciendo cuadros gastrointestinales.

IV. Abstrac

Infectious gastroenteritis is a common cause of veterinary practices, they can be caused by various pathogens; viruses, bacteria, parasites or a combination of these (Gizzi, 2014), however, only canine parvovirus type 2 (CPV-2) has been positioned as the main pathogen that most often diagnosed in the gastroenteric problems, there are several factors importance to the variability of the clinical features of canine parvovirus, mentioned that one of these factors is the association with other gastroenteric viruses such as canine coronavirus and canine rotavirus (Rimmelzwaan, 1991).

In part 1 of a screen work we were performed to determine if some of the gastroenteric viruses in other parts of the world were circulating in patients with gastroenteric pictures associated with parvovirus. 29 canine patients took some inclusion criteria (materials and methods) of which the following results: 29 dogs, 11 were positive for canine parvovirus by the method of simple PCR, 9 were positive for canine rotavirus by the method RT-PCR, 6 were reactive to canine coronavirus by indirect ELISA method. 1 dog presented salmonella ssp. 2 were negative for parvovirus, coronavirus, rotavirus gastro box had tested positive for canine distemper. Parvovirus and rotavirus were the most common pathogens in the canine population. Therefore, for the second part of the work, only the diagnosis of parvovirus and coronavirus was performed to analyze the behavior of some clinical signs of patients in a single virus infection or co-infection.

In Part 2 of the investigation the diagnosis was 50 dogs, only to parvovirus and rotavirus, because the pathogens were found with greater presence in the part of this study. The cast results were as follows: Of the 50 dogs, 82% (45/50) were positive for at least one of the two viruses, specifically, 60% (27/45) were positive only for parvovirus, 8% (7 / 45) they were positive for rotavirus and only 14% (11/45) were co-infected. Five samples were not positive for either rotavirus or parvovirus.

Clinical signs of rotavirus were less severe than those of parvovirus; exclusively infected with rotavirus, dogs show abdominal pain, lethargy, vomiting, mucoid diarrhea and sometimes leukocytosis. However, in co-infected dogs we observe severe gastrointestinal symptoms, besides leukopenia, panleukopenia, mucoid or hemorrhagic diarrhea, vomiting and lethargy.

In this study we report for the first time canine rotavirus is circulating among the dog population of a region of Mexico, was observed associated with the most common pathogen parvovirus but is also found in other joint ventures with coronavirus. Fulfilling our initial hypothesis saying that in dogs Mexico State are circulating rotavirus and coronavirus in association with parvovirus, causing gastrointestinal problems.

V. Introducción general

Las gastroenteritis infecciosas son una causa común de consultas veterinarias, pueden ser causadas por diversos patógenos, como virus, bacterias, parásitos o la combinación de estos (Gizzi, 2014), sin embargo parvovirus canino tipo 2 (PVC-2) se ha posicionado como el patógeno principal que se diagnostica con mayor frecuencia en los problemas gastroentéricos (Pérez, 2014), (Mochizuki, 2001). PVC-2 es un virus de ADN de cadena sencilla, no envuelto, tiene un diámetro de 25 nm, con un genoma de alrededor de 5000 nucleótidos, posee tres genovariantes, PVC-2a, PVC- 2b y PVC- 2c, estas genovariantes se distribuyen en el mundo, pero se menciona que PVC- 2c es la genovariante predominante en muchos países, incluyendo a México (Decaro, 2008), (Roldan, 2015). Actualmente, existe discusión en cuanto a las características clínicas de la enfermedad relacionadas con las diferentes genovariantes; para algunos autores no existe diferencia clínica en las infecciones con las diferentes genovariantes, sin embargo otros investigadores dicen que los cuadros clínicos son diferentes dependiendo de la genovariante con la que se infecten los perros (Prittie, 2004). A pesar de estos argumentos, la sinología clínica de parvovirus canino se ha descrito desde su aparición (Goddard, 2010), y se menciona comúnmente que en los cuadros clínicos típicos, los perros cursan con fiebre, anorexia, letargia, depresión, vómito, diarrea mucoide o hemorrágica y leucopenia (Meunier, 1985),(Decaro, 2007), (Shoeman,2013), sin embargo otros estudios indican que los signos clínicos no se han mantenido estables desde la aparición del PVC-2 hasta ahora, y pueden encontrarse de

manera variable, dependiendo de cada paciente, afectando no solo a cachorros, sino también a perros adultos, teniendo como resultado que actualmente se identifiquen cuadros clínicos típicos y atípicos de parvovirus (Lamm,2008).

Otro factor de importancia para la variabilidad de los cuadros clínicos en parvovirus canino es la asociación con otros virus gastroentéricos, como coronavirus canino y rotavirus canino (Rimmelzwaan, 1991).

Respecto a Coronavirus canino (CVC) se sabe que pertenece a la familia *Coronaviridae*, del género *Alphacoronavirus* (ICTV, 2015), es un virus de ARN, de una sola hebra que tiene un genoma de 27 a 32 kb (Pratelli, 2006), a pesar de que este virus es causante de infección gastrointestinal en perros, no existen datos de su presencia en México, pero los reportes de otros países indican que se manifiesta con letargia, anorexia, vómito, y diarrea. A menudo se puede encontrar en las infecciones con bacterias como *Salmonella* ssp. parásitos y virus, tales como parvovirus canino (PVC), esta asociación puede llegar a causar la muerte del animal, debido a la complicación de los cuadros clínicos. (Decaro, 2008).

Los rotavirus han sido ampliamente estudiados en niños, pero hasta ahora no existen datos de la presencia de Rotavirus canino (RVC) en México, sin embargo también se han reportado en co-infecciones por PVC y CVC en otras partes del mundo (Mochizuki, 2001). Rotavirus es virus de RNA de doble cadena, aproximadamente mide de 60 a 75 nm de diámetro, sin envoltura y con un genoma segmentado (Mihalov, 2015), pertenece a la familia *Reoviridae*, genero *Rotavirus*

(ICTV, 2015). La gastroenteritis es más común en cachorros de menos de 4 meses de edad (Yeşilbag, 2007). Los rotavirus afectan a las células epiteliales maduras en la punta de las pequeñas vellosidades intestinales, lo que tiene una leve a moderada atrofia de vellosidades y diarrea acuosa a mucoide (Mosallanejad, 2014).

La identificación de las co-infecciones en los perros que presentan parvovirus canino es importante para determinar el pronóstico y diseñar estrategias en su tratamiento y profilaxis. Aunque en otros países se han detectado patógenos gastroentéricos de manera individual con técnicas como PCR, ELISA, cultivos bacteriológicos etc. un diagnóstico para PVC-2 y algunos virus asociados (CVC y RVC) no se ha descrito en México, tampoco se sabe si las asociaciones virales y bacterianas (*salmonella ssp.*) con PVC-2 pueden causar la complicación de los cuadros clínicos.

1. Parvovirus canino

1.1 Etiología

"Parvo" significa pequeño en latín (virus pequeño) (Murphy, 1999). Parvovirus canino tipo 2 (PVC-2) es un virus de ADN descrito por primera vez en 1978 y actualmente es considerado como el principal patógeno viral que causa gastroenteritis en los caninos (Carmichael, 2005). Se ha reportado en diferentes partes de América y Europa, se describe como un virus con alta morbilidad (100%), una mortalidad de hasta 10% en perros adultos y 91% en cachorros (Prittie, 2004). PVC-2 presenta una serie de genovariantes conocidas como PVC-2a, 2b y 2c (Nandi, 2010), estas genovariantes se distribuyen en el mundo, pero se sabe que PVC- 2c es la genovariante predominante en la mayoría de los países (Decaro, 2008), en México un estudio mostro que PVC-2c es la genovariante dominante actual (Roldan, 2015).

1.2 Taxonomía

Siguiendo la clasificación del Comité Internacional de Taxonomía de Virus o ICTV (International Committee on Taxonomy of Virus) (<http://ictvonline.org/>) los parvovirus se clasifican de la siguiente manera:

Tabla 1. Clasificación jerárquica de parvovirus canino

Familia	Subfamilia	Genero	Especie	Subespecie
Parvoviridae	Parvovirinae	Protoparvovirus	Parvovirus de los carnívoros tipo 1	Parvovirus canino

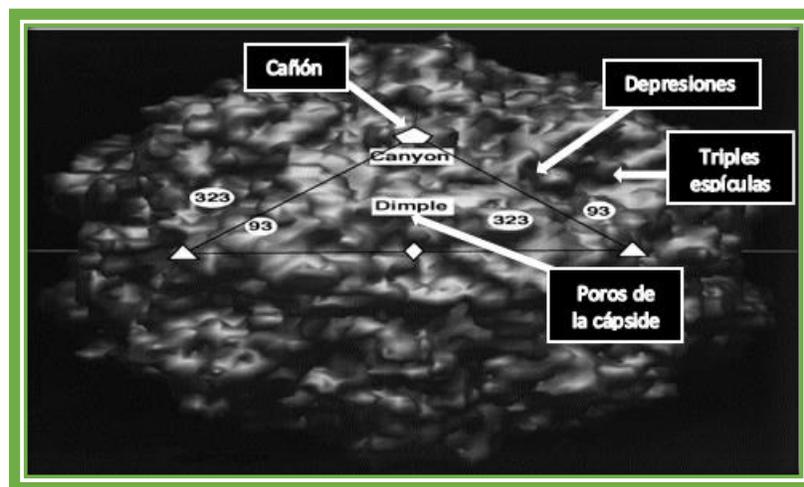
Fuente: Elaboración propia con datos de ICTV, 2015

1.3 Morfología del virus

PVC-2 conserva una simetría icosaédrica, es un virus sin envoltura, de sentido negativo que tiene un tamaño de 5.2 Kb, su cápside mide 25 nm de diámetro y envuelve una sola molécula lineal de ADN (Hoelzer y Parrish, 2010). El virión está compuesto por tres proteínas (VP1, VP2 y VP3), a pesar de las diferencias en las formas de las proteínas y la baja homología entre algunos de los virus, ahora se sabe que varios elementos estructurales destacados en la superficie de la cápside son comunes en la mayoría de los parvovirus. Estos incluyen regiones elevadas en los ejes quintuplos de

simetría, que en algunos virus podrían formar un poro en la cápside, regiones deprimidas denominados (cañones) que rodean los ejes quintuples, uno o tres protuberancias en torno a los ejes triples de simetría (espículas triples o espículas) y las regiones deprimidas (depressiones) en los ejes de doble simetría (Figura 1.) (Parrish, 1999).

Figura 1. Modelo de la superficie de la cápside de CPV, se muestran sus elementos estructurales, una unidad asimétrica de la cápside



Fuente: Modificado de Parrish, 1999.

1. 4 Propiedades del virión

PVC-2 tiene tres proteínas estructurales (VP1, VP2 y VP3) y dos proteínas no estructurales (NS1 y NS2), VP2 de (64 kDa) es el componente principal, representa el 90% de la cápside viral, lo que constituye el principal determinante de interacción virus-huésped, VP3 se deriva de VP2 (Decaro, 2008).

Se conoce que las cápsides se ensamblan a partir de un total de 60 copias de la VP1 y VP2, con cerca de 5 - 6 copias de VP1 y 54 - 55 copias de VP2 (Decaro,

2008). VP1 contiene la secuencia de VP2 de longitud completa, más un dominio adicional N-terminal (Parrish, 2003).

La particularidad de la cápside de parvovirus está en ser altamente antigénica y jugar un rol importante determinando el rango del hospedador y su tropismo hacia los tejidos (Truyen, 2006). Prácticamente todas las diferencias biológicas entre Parvovirus canino y parvovirus felino son determinadas por la cápside viral, esto se explica porque ciertas mutaciones de diversos residuos de aminoácidos (93 y 103, 299, 300, 301 y 323) limitan la gama de huéspedes de PVC-2 y están situados en la región de las triples espículas. Los residuos 93, 103 y 323 que hacen la diferencia entre PVC y PVF determinan la capacidad de replicarse en células caninas (Miranda, 2015).

1. 5 Genoma viral

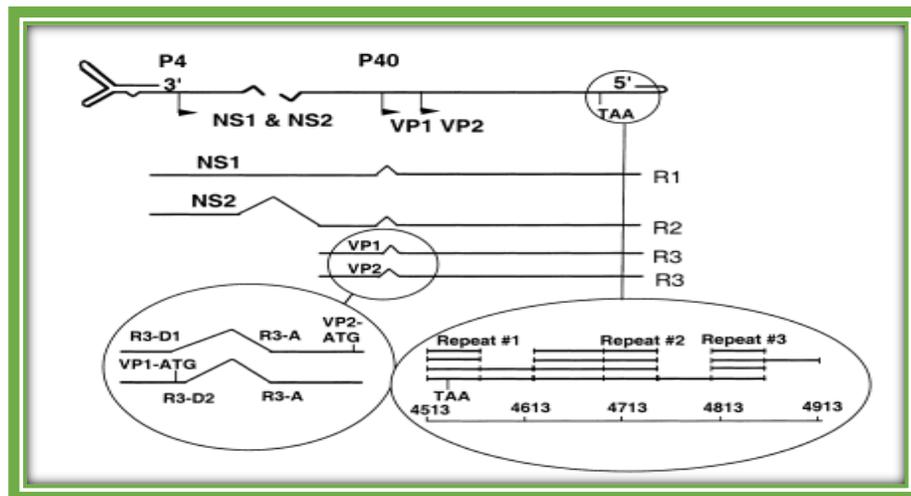
Los parvovirus son tanto pequeños como genéticamente simples (Parrish, 2003). El genoma de PVC-2 es una sola cadena de ADN, de aproximadamente 5000 nucleótidos que tienen dos marcos abiertos de lectura (ORFs) que resultan en la expresión de dos proteínas estructurales (VP1 y VP2) y dos proteínas no estructurales (NS1 y NS2) a través de empalme alternativo del RNAm viral (Parrish, 1999). Sólo la cadena de ADN se empaqueta en la cápside.

Una región no codificante cerca del extremo derecho del lado del genoma que contiene un número variable de secuencias repetidas directas, y hay horquillas

palindrómicas en cada extremo del genoma que se utilizan en la replicación del ADN viral (Agbandje, 1995).

El genoma tiene palíndromos terminales de 150 bases. Los promotores en las unidades del mapa genómico 4 y 40 dan lugar a $(R1 \pm R3)$ para las proteínas no estructurales (NS) y proteínas de la cápside (VP), respectivamente. NS1 y NS2, y VP1 y VP2 se forman por corte y empalme alternativo del mismo RNAm. Tres secuencias en el extremo 50 del genoma pueden estar presentes como copias simples o múltiples. (Figura. 2).

Figura 2. La estructura genética del genoma de CPV. ADN genómico de parvovirus canino y su estrategia de transcripción



Fuente: Parrish, 1999.

1. 6 Replicación viral

La replicación del virus tiene lugar en los núcleos celulares y requiere de células en rápida división, de los tejidos hematopoyéticos e intestinales de animales jóvenes y adultos (Decaro, 2007). La infección viral se da en células susceptibles y comienza con la unión al receptor en la membrana plasmática, el receptor para parvovirus canino es el receptor de transferrina, la introducción a la célula se da por endocitosis (Shackleton, 2005). La replicación de parvovirus está íntimamente relacionada con la replicación celular, debido a que ocurre solo en células que se encuentran en la fase S mitótica del ciclo celular (MacLachlan, 2011).

Una vez dentro de las células, los viriones pasan a través de las vías endosomales dentro del citoplasma incluyendo al endosoma temprano y tardío, no se tiene claro cómo se lleva a cabo la salida de las partículas del sistema endosomal, sin embargo la proteína VP1 del virus contiene una fosfolipasa A2 en su región única N-terminal que puede estar involucrada en la modificación de la membrana endosomal, lo que facilita la liberación de la cápside. Posteriormente, las partículas que entran en el citoplasma son transportadas al poro nuclear y la partícula entra al núcleo donde se lleva a cabo la replicación viral (Buonavoglia, 2001).

Como se describió anteriormente la replicación del ADN viral y el ensamble de la cápside tienen lugar en el núcleo y es necesaria la fase S del ciclo celular de la célula huésped para llevar a cabo este proceso, debido a que el ADN viral necesita

la maquinaria de replicación de la célula anfitriona porque el virus no codifica alguna enzima que tenga esta función , por lo tanto las ADN polimerasas celulares replican el ADN viral para formar intermediarios de ADN doble cadena el cual se utiliza como molde para la transcripción de los ARNm virales (Kang, 2008).

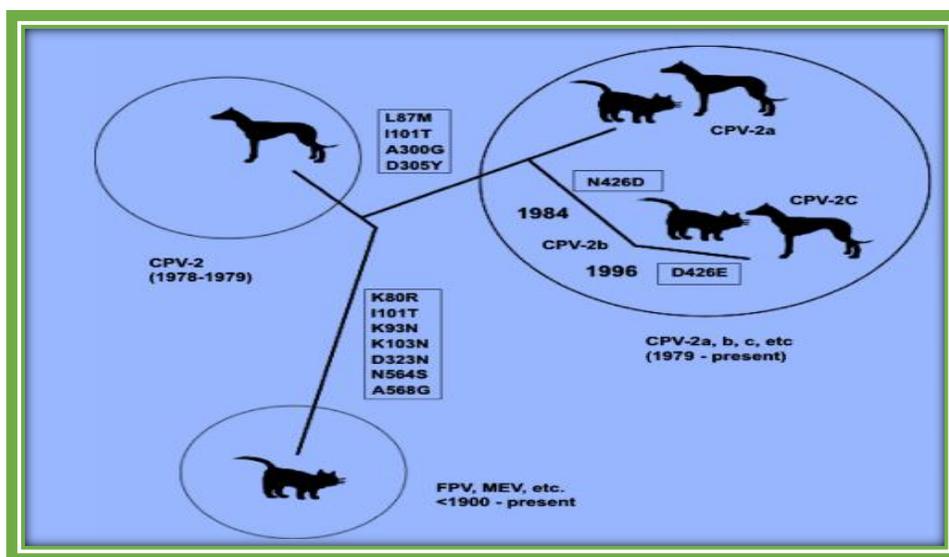
El empalme alternativo da lugar a varios tipos de RNAm que se traducen en cuatro proteínas principales y otras proteínas adicionales pequeñas que no se encuentran bien caracterizadas (Decaro, 2008). El RNAm más abundante se encuentra codificando un marco abierto de lectura hacia el extremo 5' que codifica las proteínas estructurales, el extremo 3' del genoma codifica las proteínas no estructurales (NS1) que tienen diversas funciones como: 1) unirse al extremo 5' del ADN viral durante la replicación, 2) Servir como una helicasa de ADN durante la replicación y el empaquetamiento de ADN, 3) Funciona como un sitio de corte en una hebra simple de ADN, 4) Mediación de la detención de la célula en la fase G1 del ciclo celular. El mecanismo de replicación del genoma es descrito como un modelo de horquilla, se considera un mecanismo complejo por lo que existen varios detalles que todavía no se están muy claros (Calderon, 2009).

1.7 Epidemiología

Se han presentado diferentes teorías sobre el origen de PVC, algunos autores sostienen que parvovirus canino surgió como una variante del virus de la panleucopenia felina (VPF) mediante una mutación directa, otra teoría indica que surgió de una mutación sobre el virus de la vacuna que era utilizada inicialmente

para proteger a los perros de la infección, sin embargo existe una tercer teoría que dice que el virus se originó a partir de un ancestro viral que se encontraba en carnívoros silvestres (Truyen,2006). La hipótesis más común y relevante es la que afirma su origen a partir de la evolución en mutaciones que se originaron a partir de la panleucopenia felina (figura 3) (Hoelzer, 2010).

Figura 3. Comprensión actual de la evolución CPV



Fuente: Tomada de Hoelzer, 2010.

Aún existen especulaciones respecto al origen de parvovirus canino, pero se han descrito mediante los diversos brotes, por ejemplo; se refiere que durante la década de 1970, se presentó una nueva enfermedad infecciosa en los cachorros, que tenía como característica principal ser una enfermedad gastroentérica y con algunos casos de miocarditis, en diversas partes del mundo se observaba por microscopía electrónica un pequeño y redondo virus sin envoltura en las muestras de heces y en

los tejidos de los animales afectados, se designó con el nombre de virus diminuto de los caninos (PVC) al cual se le considero responsable de la muerte neonatal en cachorros (Rezabebek, 2008; Mojan, 2010). Más tarde se le dio el nombre de parvovirus canino tipo 1 (PVC-1) (Lamm, 2008).

Posteriormente, en el año de 1978 parvovirus canino tipo 2(PVC-2), fue reconocido como el agente causal de una epizootia severa de gastroenteritis en perros, caracterizada por depresión, pérdida de apetito, vómito, diarrea mucoide o hemorrágica y leucopenia (Carmichael, 2005; Gallo, 2009; Decaro, 2008). Fue hasta 1980 que la cepa original PVC-2 evoluciona hacia el tipo 2a (PVC-2a), posteriormente, en 1984 apareció otra variante designada tipo 2b (PVC-2b) ambas identificadas mediante anticuerpos monoclonales (Truyen, 2006). Por último, en Italia en el año 2001 fue detectada una nueva genovariante, PVC-2c que ya ha sido identificada en otros países europeos así como en Asia, África y México (Buonavoglia, 2001, Gallo, 2009).

1. 8 Patogenia

La transmisión ocurre por la vía fecal-oral, después de la exposición al virus en las heces o vómito, o el virus que persiste en fómites (Sykes, 2015). Durante los primeros 2 días después de la ingestión, la replicación viral se produce en la orofaringe y el tejido local linfoide, mesentérico y se disemina a las criptas intestinales del intestino delgado por viremia; que se produce por el tercero a quinto

día después de la infección, con la orientación preferentemente a tejidos con rápida división celular (Smith, 1997). La viremia es considerable en el plasma uno a cinco días después de la infección. Posterior a la viremia el virus se localiza predominantemente en el epitelio que recubre la lengua la mucosa oral y del esófago y en intestino delgado y tejido linfoide como timo, ganglios linfáticos y medula ósea (Hoskins, 2000). Las células epiteliales de las criptas intestinales maduran en el intestino delgado y después migran del epitelio germinal de criptas intestinales a las puntas de las vellosidades. Al llegar a estas últimas, las células epiteliales intestinales adquieren su capacidad de absorción que es necesaria para la asimilación de nutrientes. Sin embargo, parvovirus canino infecta el epitelio germinal de las criptas intestinales, consecuentemente, origina la destrucción y colapso del epitelio, como resultado se deteriora el repuesto normal de las células y se acortan las vellosidades. PVC-2 también destruye precursores activos de los leucocitos circulantes y las células linfoides (Prittie, 2004). Por lo tanto, se sabe que en infecciones graves los resultados suelen ser neutropenia y linfopenia. Otras complicaciones son las causadas por infecciones bacterianas secundarias de microflora gram negativa y anaerobia causan daño intestinal, bacteremia, endotoxemia y coagulación intravascular diseminada (Hoskins, 2000; Goddard y Leisewitz, 2010). Las células más afectadas en los cachorros son los tejidos linfoides, epitelio intestinal, médula ósea, y el corazón. La miocarditis se produce sólo si los recién nacidos se ven afectados durante el período de rápida proliferación de células del miocardio (que comienza en el útero y se concluirá en las primeras 2

semanas de vida). Esta última forma de la infección por PVC-2 es raro hoy en día debido a la inmunidad de la población y la protección de los anticuerpos maternos (Martin, 2002) (Prittie, 2004).

1. 9 Semiología

Los signos clínicos iniciales que están asociados con la gastroenteritis por PVC-2 son inespecíficos, pueden incluir de manera general solo anorexia, depresión y fiebre (Prittie, 2004). Los cachorros pueden presentar signos como vómitos y desarrollan diarrea mucoide o hemorrágica y leucopenia dentro de 24-48 horas después de los signos clínicos iniciales (Schoeman, 2013). La pérdida de fluidos a través del tracto gastrointestinal puede resultar en una deshidratación grave que puede causar un shock hipovolémico, una azoemia prerrenal y posible complicación con insuficiencia renal aguda (Sellon, 2007). Actualmente los signos clínicos de parvovirus canino no se han mantenido estables y dependerán también del estado general del animal o de la presencia de co-infecciones con otros virus o bacterias (Hoskins, 2000).

1. 10 Lesiones histopatológicas

Los parvovirus causan una amplia gama de cambios histológicos que varían de mínimos a severos. En la necropsia, el hallazgo más común es la enteritis segmentaria, la serosa de las zonas afectadas es a menudo de color rojo oscuro áspero y la mucosa suele ser lisa y vidriosa debido a la pérdida de las vellosidades. Los pequeños contenidos intestinales pueden variar de mucosa amarilla o hemorrágica (Decaro,

2008). Los segmentos de intestino se ven afectados de forma variable. El virus infecta normalmente el intestino delgado proximal y progresa por el intestino delgado. El intestino grueso es raramente afectado (Patrelli, 2009). En los casos agudos, hay necrosis multifocal de las criptas y cuerpos de inclusión intranucleares se observan con frecuencia en el intestino. A medida que la enfermedad progresa, se produce una pérdida de la arquitectura de la cripta con pérdida de vellosidades, fusión, o desprendimiento. Aunque el intestino delgado tiene los cambios histológicos más llamativos, también inclusiones virales se pueden apreciar en una variedad de órganos, especialmente el corazón, por lo tanto, de manera poco común se puede observar miocarditis con cuerpos de inclusión intranucleares se puede ver en una fracción de los casos, especialmente en los animales más jóvenes (Goddard, 2010).

2. Coronavirus

2.1 Etiología

El coronavirus es un virus envuelto, monocatenario de ARN, causante de enfermedad respiratoria y enfermedad gastroentérica en los mamíferos y las aves. En los perros, tres variantes de coronavirus se ha descrito hasta el momento; Coronavirus canino (CoVc) tipo I (CoVc-I) y tipo II (CoVc-II), que pertenecen al antiguo grupo antigénico 1 (Decaro, 2008) (Buonavoglia, 2011), recientemente clasificado como un nuevo género denominado Alphacoronavirus (Carstens, 2009).

2. 2 Taxonomía

Siguiendo la clasificación del Comité Internacional de Taxonomía de Virus o ICTV (International Committee on Taxonomy of Virus) (<http://ictvonline.org/>) los coronavirus caninos se clasifican de la siguiente manera:

Tabla 2. Clasificación jerárquica de coronavirus canino

Orden	Familia	Subfamilia	Especie	Subespecie
Nidoviral	Coronaviridae	Coronavirine	Alfacoronavirus1	Coronavirus canino

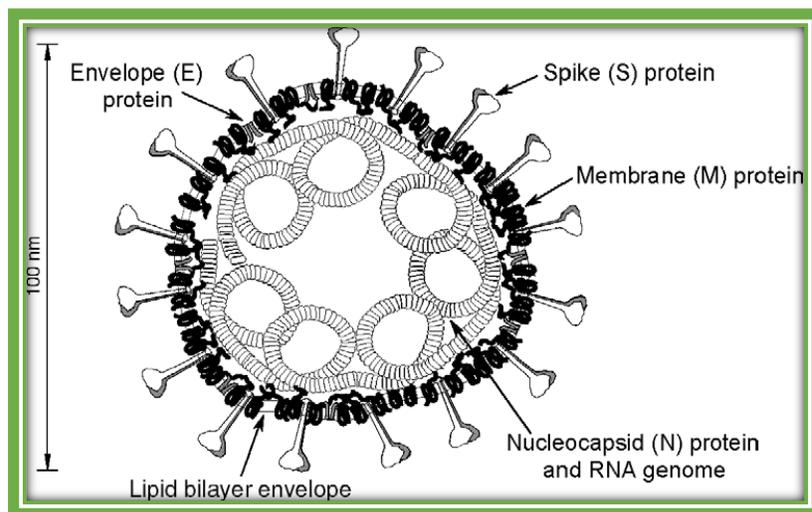
Fuente: ICTV, 2015.

2. 3 Morfología del virus

Los coronavirus son más o menos esféricos y moderadamente polimórficos, los viriones típicamente tienen diámetros medios de 80 a 120 nm. Las espículas de la superficie o peplómeros de estos virus, se han descrito en forma de pera, o en forma de pétalo de 17-20 nm de la superficie del virión (McIntosh, 1974), tienen una base delgada que se hincha a una anchura de aproximadamente 10 nm en el extremo distal del virión.

Las proteínas estructurales comprenden la proteína de la espícula (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N), proteínas codificadas por ORF2, ORF4, ORF5 y ORF6, respectivamente (Decaro, 2005) (figura 4).

Figura 4. Esquema del virión de coronavirus canino, con el conjunto de sus proteínas estructurales.



Fuente: Tomado de Decaro 2005

2. 4 Propiedades del virión

Las proteínas estructurales tienen diferentes funciones que le confieren propiedades al virión (tabla 3).

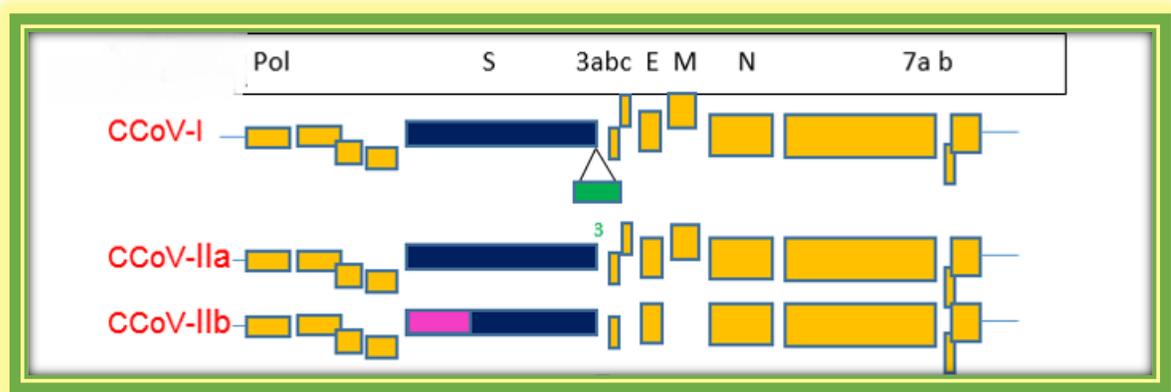
Tabla 3. Propiedades del virión.

Proteína S	Proteína E	Proteína M	Proteína N
La proteína espícula trimerica (S), es la inductora principal de anticuerpos neutralizantes del virus.	La pequeña proteína de membrana (E), recientemente reconocido como componente estructural de los coronavirus.	La proteína de membrana (M), el más abundante componente estructural	Es una fosfoproteína altamente básica que modula la síntesis de ARN viral
Forma peplómeros que median la unión del virus a su receptor específico de la célula.	Se cree importante para el montaje de envoltura viral.		Se une al ARN viral y forma una nucleocápside helicoidal

2. 5 Genoma viral

El genoma del coronavirus está compuesto por dos tercios de 2 grandes de marcos abiertos de lectura (ORFs), ORFs1a y ORFs1b que codifican dos poliproteínas que conducen a la formación de la replicasa viral. El primer tercio del 3' del genoma consiste de otro ORFs que codifica para proteínas estructurales y otras no estructurales (figura 5).

Figura 5. Genoma del coronavirus canino, sus diferentes variantes



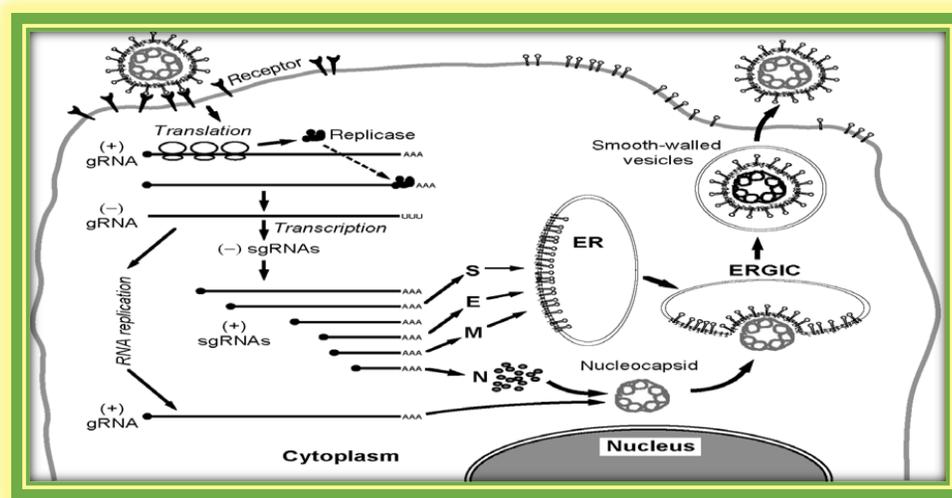
Fuente: Modificado de Poder, 2011.

2. 6 Replicación viral

El genoma de sentido positivo, que también sirve como el primer ARNm de la infección, se traduce en la enorme poliproteína replicasa. La replicasa utiliza entonces el genoma como molde para la síntesis, a través de intermediarios de cadena negativa, de ambos genomas progenie y un conjunto de mRNAs

subgenómicos. En la superficie celular de la proteína S puede causar la fusión de una célula infectada con células adyacentes, no infectadas (Masters, 2001) (figura 6). Las infecciones por coronavirus se inician por la unión del virión a receptor celular. Esto pone en marcha una serie de acontecimientos que terminan en la deposición de la nucleocápside en el citoplasma, donde el genoma viral se traduce.

Figura 6. Ciclo replicativo



(Tomado de Masters, 2001).

2. 7 Epidemiología

Dentro de las especies de CVCa, hay dos serotipos distintos (tipo I y tipo II), ambos con vía de transmisión fecal- oral (Regan, 2012), (Decaro, 2008), (Buonavoglia, 2011), estos serotipos comparten aproximadamente el 90% de identidad de secuencia en la mayor parte de su genoma (Martino, 2010), pero ambos genotipos

difieren principalmente en la proteínas S (espícula) ya que comparten sólo el 54% de identidad de aminoácidos.

Por otra parte, los tipos CVCa-I poseen un ORF único, 624 nt de longitud, que está completamente ausente en las cepas de coronavirus felino tipo I y del que sólo quedan restos en los genomas de CVCa-II y Virus Gastroenteritis transmisible de la especie porcina (TGEV).

Las cepas de CVCa-I fueron identificadas al comienzo de la década del 2000 cuando Pratelli y compañeros de trabajo destacaron que cepas de coronavirus similares a coronavirus felino compartían alta homología con Coronavirus felino y estaban circulando en la población canina (Pratelli, 2002).

Recientemente el genotipo de CVCa-II se dividió en dos subtipos, CVCa-IIa (cepas clásicas) y CVCa-IIb (cepas parecidas a TGEV-), que aparece como el resultado de una recombinación entre CVCa-II y TGEV (Decaro, 2010). Además, el tipo II CCoV se dividió en dos subtipos, IIa y IIb. La infección CCoV generalmente tiene una baja mortalidad; Sin embargo, un tipo de coronavirus canino pantotrópico recientemente caracterizado fue detectado en Italia CVCa IIa (CB / 05) y dio lugar a una enfermedad mortal como consecuencia de la diseminación sistémica del virus (McElligott, 2010), en mayo del 2005, un brote severo de la enfermedad fatal, sistémica afectó siete perros alojados en una tienda de mascotas en la región de Apulia, Italia (Decaro, 2008).

Recientemente, un tipo IIa CCoV cepa CB / 05 con alta virulencia se informó en Europa. Los cachorros infectados-05 CB / signos clínicos mostraron como letargo, vómitos, diarrea y linfopenia aguda, y el genoma viral se observó en tejidos extraintestinales, incluyendo el cerebro. Además, la respuesta inmune inducida por CCoV entérico no protege a los perros de la infección con CB / 05. Pruebas contradictorias sobre la prevalencia relativa de CCoV I y II, con algunos estudios que sugieren el tipo I es más común (Decaro *et al.*, 2005; Stavisky *et al.*, 2010), y otros que sugieren tipo II (Decaro *et al.*, 2011;.. Soma *et al.*, 2011), pero estos resultados dependerán de un número de factores incluyendo la naturaleza de la muestra y la población. La aparición de la infección dual con ambos tipos se ha informado, tanto de forma natural y experimentalmente (Terada, 2014).

2. 8 Patogenia

La transmisión de coronavirus ocurre por la vía fecal-oral, después de la exposición al virus en las heces o vómito, o alimentos y agua contaminada. El periodo de incubación es corto: 1 a 4 días en campo y solo 24 a 48 horas en forma experimental. Puede aislarse CVC de la materia fecal en perros infectados aproximadamente entre 3 y 14 días pos infección. Después de la ingestión, el virus llega a las células epiteliales maduras de las vellosidades del intestino delgado. Después de que las células M captan el CVC en el domo epitelial de las placas de peyer, el virus y el antígeno viral se transporta el tejido linfático. Después de la producción del virus maduro, las células infectadas desarrollan cambios

citoplasmáticos graves, y las microvellosidades del borde en cepillo se acortan, deforman y pierden (Greene, 1998). Las vellosidades afectadas se ven cubiertas por epitelio cilíndrico a cuboide bajo, muestran niveles variables de atrofia y fusión vellosa. A diferencia de la infección por PVC, son poco frecuentes la hemorragia y la necrosis vellosa. Las infecciones leves no presentan hallazgos macroscópicos significativos. En casos graves, las asas intestinales están dilatadas y llenas de materia fecal delgada, acuosa y de un color verde amarillento. La Producción de anticuerpos locales (IgAs) restringe la propagación del virus en el intestino y las detenciones el progreso de la infección. Los perros infectados en general arrojan CVC en las heces durante 6-9 días después de la infección, pero algunos perros infectados de forma natural diseminan el virus durante un período hasta de 6 meses después de que los signos clínicos cesen (Martino, 2010).

2. 9 Semiología

Por lo general se manifiestan en los cachorros jóvenes con letargo, anorexia, vómitos, y diarrea, que dura 1-2 semanas. Las heces son generalmente suaves a acuosa, con un color amarillo a verde, y a veces la diarrea hemorrágica también puede ser observada. La mayoría de los animales se recuperan después de un período de 7-10 días. Por lo general, la enfermedad sistémica no se observa durante la infección, aunque el virus se ha aislado a partir de tejidos diferentes (las amígdalas, los pulmones y el hígado) de las crías infectadas experimentalmente (Decaro, 2008).

La infección por CCoV es generalmente restringida al tracto gastrointestinal, (Decaro 2012). Los signos clínicos pueden ser graves e incluyen diarrea, vómitos, deshidratación y muerte ocasional ya que CVCa a menudo se encuentran en infecciones concurrentes con bacterias *clostridium perfringens*, *campilobacter ssp*, *helicobacter ssp*. Y *salmonella ssp.*, u otros virus, tales como adenovirus canino, parvovirus canino o distemper canino aumenten la gravedad de los signos provocados por CVC (Patrelli, 2007). La enfermedad leve o asintomática probablemente es en muchos casos comunes resultados de la infección (Ntafis, 2013). La enfermedad tiene una tasa de mortalidad baja pero se considera como extremadamente contagiosa, especialmente en lugares como perreras y refugios de animales. Sin embargo, durante los últimos años, también se han dado informes asociados con la enfermedad mortal causada por cepas detectadas en órganos de perros adultos, así como en el tracto entérico (Ntafis, 2010).

2.10 Lesiones histopatológicas

Es común que los ganglios linfáticos mesentéricos estén agrandados y edematosos (Jobs, 2001). La atrofia y fusión de las vellosidades intestinales y la profundización de las criptas caracterizan las lesiones por CVC. También se presenta un aumento de celularidad de la lámina propia, aplanamiento de las células epiteliales superficiales y una descarga de células caliciformes, los coronavirus caninos inducen a la apoptosis de la célula afectada (Martino, 2010).

3. Rotavirus

3. 1 Etiología

Rotavirus es conocido como uno de los más importantes patógenos entéricos neonatales en muchas especies incluidos los humanos y los perros (Kobayashi, 1993). Rotavirus canino (RVC) es un virus redondo de ARN con doble cadena, aproximadamente mide de 60 a 75nm de diámetro, no presenta envoltura (Martella, 2001). En la clínica de pequeñas especies se consideraba de poca importancia, sin embargo, es posible que se produzca de vez en cuando la transmisión entre especies, existen informes de casos documentados de infección por rotavirus canino en niños en diversas partes del mundo (Luchs, 2012).

3. 2 Taxonomía

Siguiendo la clasificación del Comité Internacional de Taxonomía de Virus o ICTV (International Committee on Taxonomy of Virus) (<http://ictvonline.org/>) los rotavirus caninos se clasifican de la siguiente manera:

Tabla 4. Clasificación jerárquica de rotavirus canino

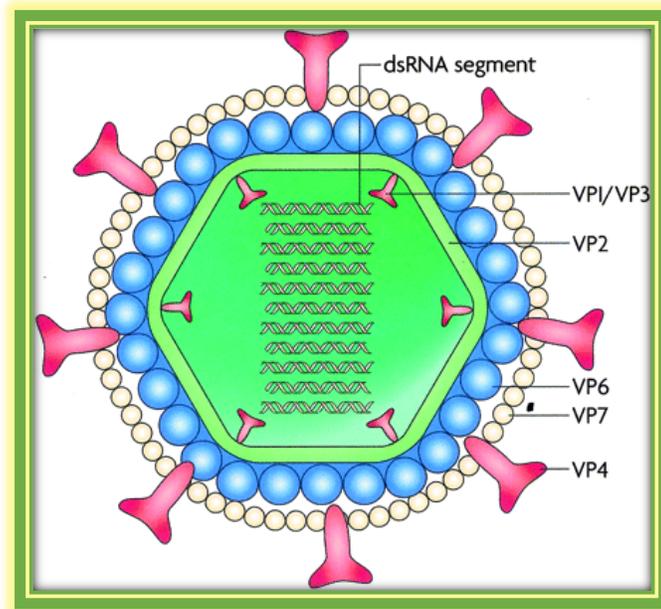
Orden	Familia	Subfamilia	Especie	Subespecie
-	Reoviride	Sedoreovirine	Rotavirus A	Rotavirus canino

Fuente: (ICTV, 2015)

3.3 Morfología del virus

Rotavirus canino tiene aproximadamente 60 a 75 nm de diámetro, comprenden un núcleo interno que contiene un genoma de once segmentos de ARN de doble cadena y el complejo de transcripción / replicación, una capa intermedia (cápside interior) que consiste en la proteína viral 6 (VP6), y una capa exterior hecha de VP7 y VP4, esta última sobresale como espículas (Figura 7.)(Gray, 2011).

Figura 7. Representación esquemática de un virión rotavirus.



Fuente: Tomada de Gray, 2011

Las proteínas de la cápside externa VP4 y VP7 sirven en la neutralización de antígenos y definen los serotipos P y G, respectivamente. El interior proteína estructural de la cápside VP6, es el antígeno de subgrupo (Dennehy, 2008).

3. 4 Propiedades del virión

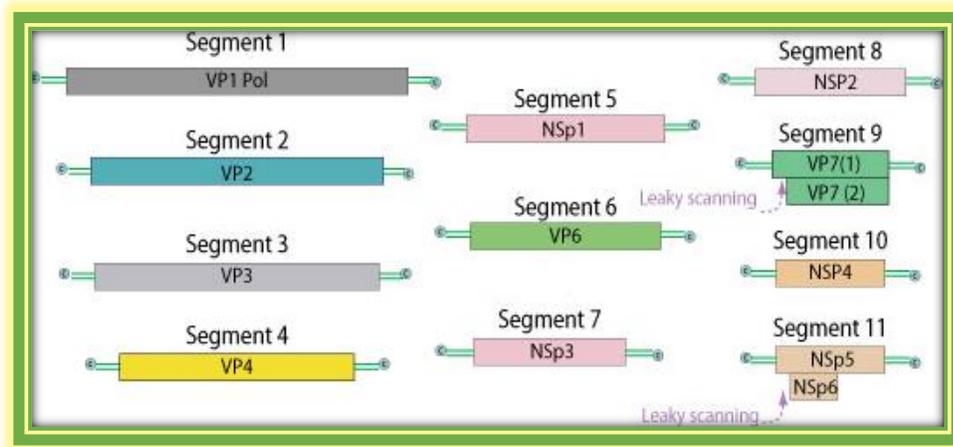
Seis de las proteínas se encuentran en la partícula viral (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7), mientras que las cinco restantes son proteínas no estructurales (NSP1 - NSP5) (Burke, 1996). Rotavirus se clasifica en los serogrupos A- E basados en las propiedades antigénicas (Tian, 1995).

Varios de los genes de rotavirus se han asociado con su capacidad para causar la enfermedad (Morris, 1999). Las proteínas no estructurales NSP1, NSP2 y NSP4 se cree que están involucradas en la virulencia en perros (Broome, 1993) y las proteínas estructurales VP3 y VP7 en especies como cerdos (Hoshino, 1995). Por último, la proteína estructural VP4 está involucrada en un número de propiedades in vitro, incluyendo restricción del crecimiento en cultivo celular, infectividad y la formación de placa y la unión a células. Además, VP4 se ha demostrado estar implicado en la virulencia y la patogenicidad en ratones (Jolly, 2000).

3. 5 Genoma viral

Tiene un genoma segmentado (11 segmentos) de doble hebra de genoma de ARN. Cada uno de los 11 códigos de genes para un único producto génico que codifican para 6 proteínas estructurales (VP1 a VP4, VP6 y VP7) y 6 proteínas no estructurales (NSP1, NSP3, NSP4, NSP6, NSP2, NSP5) (Figura 6) (Song, 2009).

Figura 8. Esquema de genoma segmentado de rotavirus canino.



Fuente: <http://www.Viralzone.com>, 2015

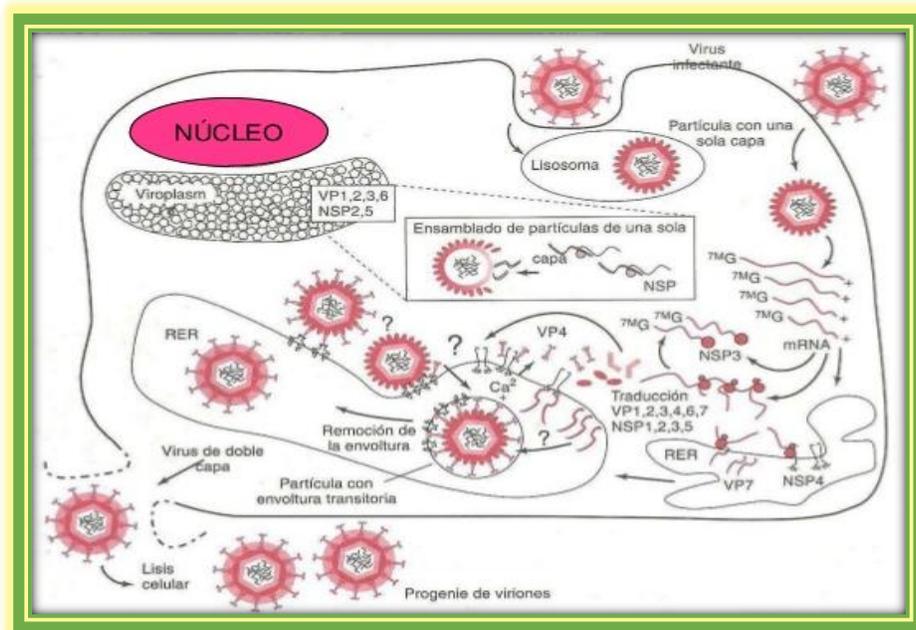
3. 6 Replicación viral

La polimerasa viral sintetiza ARNm a partir de cada uno de los segmentos de ARN de doble cadena. Estos mRNAs son trasladados al citoplasma de la célula donde se traducen. Otras proteínas son producidas por fugas de escaneo y procesamiento de proteínas (Carter, 2012).

Este virus infecta sólo enterocitos en las puntas de las vellosidades intestinales, causando la atrofia de las vellosidades e inflamación. La entrada del virus comienza con la unión de vp4 proteína viral que funciona como ligando al receptor celular ácido siálico (SA), también están involucradas algunas integrinas (proteínas de integración celular (Sebire, 2004). El ciclo de replicación termina cuando el virus es liberado al lumen intestinal por lisis celular. Se ha visto en estudios experimentales

que la proteína NSP4 produciría cambios en la permeabilidad de la membrana del retículo endoplásmico rugoso y eventualmente muerte celular (Martella, 2011).

Figura 9. Ciclo replicativo de rotavirus canino



Fuente: Tomado de shoman, 2011

Durante el proceso de entrada, la partícula viral pierde las proteínas de la capa externa y se activa la transcripción que depende de la RNA polimerasa viral (VP1) (Figura 7). Los transcritos virales recién sintetizados tienen dos funciones; por una parte funcionan como mRNAs que dirigen la síntesis de las seis proteínas estructurales (VP1-VP7) y las seis proteínas no estructurales (NSP1-NSP6) del virus y por la otra, sirven como plantillas para la síntesis de la cadena negativa (que es

complementaria al mRNA) y da lugar al RNA de doble cadena (dsRNA) que constituye el genoma viral (Patton, 2007).

Una vez que se acumula una masa crítica de proteínas virales, de 3 a 4 horas después de la infección, se forman en el citoplasma celular estructuras electrodensas llamadas viroplasmias en donde se ha propuesto que se lleva a cabo la replicación del genoma viral. En estas estructuras también se ensamblan las partículas de doble capa que posteriormente geman al interior del retículo endoplásmico y adquieren durante este proceso la tercera capa protéica, dando lugar a la partícula madura (Figura 9). Las proteínas NSP2 y NSP5 son esenciales para la formación de los viroplasmias, ya que en ausencia de cualquiera de ellas no se forman estas estructuras y el ciclo replicativo del virus se interrumpe (Silvestri, 2004).

Poco tiempo después de su entrada, el virus se apodera de la maquinaria de síntesis de proteínas de la célula, de modo que la mayoría de las proteínas que son sintetizadas durante la infección son las proteínas virales y la síntesis de proteína celular se ve casi abatida completamente. Los mRNAs virales tiene una estructura Cap- en el extremo 5', pero a diferencia de la mayoría de los mRNAs celulares, no contienen poli-A en el extremo 3', y en su lugar, tienen una secuencia consenso (GACC3') que está conservada en los once segmentos del RNA viral (Campagna, 2005).

En los viroplasmias, o fábricas virales, es donde los mensajeros virales cumplen su segunda función, servir como templado para la replicación del genoma. La serie de

eventos necesarios para este proceso no se conocen completamente, sin embargo, se han descrito complejos de RNAs con proteínas virales que han sido propuestos como intermediarios de replicación (IRs). La unidad mínima está formada por las proteínas VP1 y VP3 en asociación con el mRNA. El siguiente intermediario se define como el pre-core, en el que además de VP1 y VP3, se añaden las proteínas NSP2 y NSP5, las cuales probablemente ayudarían a un proceso activo de entrada del mRNA hacia el interior del core, al que se ha agregado VP2; es en estos IRs donde se lleva a cabo la replicación del genoma viral. Posteriormente, VP6 se ensambla sobre el core, para formar a la partícula de dos capas, la cual ya contiene los elementos necesarios para llevar a cabo una nueva ronda de transcripción del genoma (Patton, 2007).

3. 7 Epidemiología

En 1973 la Dra. Ruth Bishop logro realizar el aislamiento viral del rotavirus en niños que presen gastroenteritis, apartir de esta fecha se empezo a reliazar diversos estuios en diferentes especies, como el perro, en algunos estudios se han podido identificar rotavirus canino en heces por medio de la microsopia electronica, RT-PCR y rotoforesis (López, 2007).Las infecciones se producen en todo el mundo de forma endémica, sobre todo en bajos ingresos. La epidemiología de estas infecciones es compleja. La transmisión es principalmente por la vía fecal- oral (Salim, 1995).

3. 8 Patogenia

La vía de entrada es fecal- oral, rotavirus infecta a los enterocitos maduros en la parte superior de las vellosidades del intestino delgado, que en última instancia conduce a la diarrea.

Los modelos recientes sugieren que los rotavirus interactúan primero con un receptor de ácido. Se ha propuesto que los receptores podrían ser parte de lípidos que reconocen a las integrinas.

Los rotavirus afectan al epitelio maduro de las células en las puntas de las vellosidades intestinales pequeñas, que conducen a leve atrofia de vellosidades y moderada - acuosa a diarrea mucoide que normalmente se resuelve dentro de 8-10 días. La gastroenteritis es más visto en cachorros jóvenes de menos de 12 semanas de edad (Yeşilbag, 2007). Es posible que de vez en cuando la transmisión entre especies ocurrir. Existen Informes de casos documentados de infección por rotavirus caninos en los niños (Kapikian et al 2001), Por lo tanto, se deben tomar precauciones de higiene adecuadas la manipulación de heces diarreicas de los perros. El papel de los perros como la fuente de las infecciones humanas no ha sido totalmente investigado, pero actualmente se reconoce a rotavirus canino como un virus zoonotico (Iturriza, 2004).

3. 9 Semiología

Periodo de incubación de 1-5 días después de ingerir partículas virales, el modo de infección es por la vía fecal-oral, los signos clínicos son inespecíficos, con diarrea mucoide, vómito, dolor abdominal, algunos perros presentan leucopenias, pero esto se encuentra asociado a infecciones mixtas con parvovirus canino. También se produce anorexia, letargia en animales menores de 2 meses de edad (castro, 2011).

3.10 Lesiones histopatológicas

Gran número de investigadores han estudiado los cambios histológicos que se producen en el intestino después de la infección por rotavirus. En la mayoría de los casos estos estudios tienen animales de forma natural y experimentalmente infectados involucrados. Se puede observar un cambio en el epitelio columnar a cúbico y vellosidades que quedaron atrofiadas y acortadas. Estos cambios pueden ocurrir dentro de 24 h de infección y son más pronunciadas en el intestino delgado proximal. Rotavirus daña las células apicales de las vellosidades, el músculo de la porción apical se desestabiliza y se retrae, generando el acotamiento de la vellosidad y las puntas de las vellosidades se observan hinchadas (Holmes, 1995).

4. Asociaciones de algunos patógenos con PVC-2 en gastroenteritis

Diversos autores escriben trabajos donde se presentan algunos virus asociados a parvovirus canino; en la gastroenteritis viral canina se han identificado cuatro virus como las causas esenciales de gastroenteritis en perros: 1) parvovirus canino, 2) coronavirus canino, 3) rotavirus canino, 4) distemper canino (Pollock, 2005). La diarrea infecciosa canina se ha considerado un problema importante para los veterinarios, debido a su variabilidad patogénica y a la presencia simultánea de virus, bacterias, protozoos y co-infecciones. Se describe que parvovirus es el agente que más comúnmente se diagnostica, existe otro factor de importancia para la variabilidad de los cuadros clínicos y es la asociación con otros patógenos gastroentéricos, debido a que cuando se presenta la enfermedad clínica es más grave en cachorros jóvenes en crecimiento rápido, que alojan parásitos intestinales, protozoarios y ciertas bacterias entéricas, como *Clostridium perfringens* y *Salmonella* (Hoskins, 2000).

La importancia de las infecciones virales concurrentes como causa de la enteritis fatal severa en los perros se especuló inicialmente basada en investigaciones de casos en el que múltiples agentes infecciosos se informaron, tales como Parvovirus canino tipo 2, coronavirus y rotavirus o hasta los 3 virus simultáneamente. Esto llevó a estudios experimentales que demostraron que la gravedad de los signos clínicos fueron más pronunciados en los perros que tenían ambas infecciones Parvovirus tipo 2 y coronavirus canino en comparación con el Parvovirus canino tipo 2 solo

(Evermann, 2005). Por ejemplo un estudio de Castro, 20013, nos muestra los cambios clínicos, hematológicos y bioquímicos de perros infectados con coronavirus canino y parvovirus canino mostrando los parámetros que se dan si el coronavirus o parvovirus se presenta de manera individual. En conclusión, estos datos refuerzan que los resultados de laboratorio pueden ser indicadores útiles de la evolución clínica de los cachorros con enteritis por CVC / PVC-2/RVC o en infección mixta. El conocimiento de estos parámetros puede alertar a los médicos la posibilidad de complicaciones e indicar la necesidad de intervenciones terapéuticas urgentes (Castro, 2013).

5. Técnicas de Diagnóstico (parvovirus, coronavirus, rotavirus)

El diagnóstico para parvovirus debe ser rápido, esto es importante con el fin de identificar a perros infectados para prevenir infecciones de animales susceptibles y establecer el tratamiento adecuado. Por lo tanto, se han desarrollado múltiples técnicas de laboratorio para la identificación de PVC-2, entre ellas se encuentra la técnica de hemoaglutinación (HA) combinada con inhibición de la hemoaglutinación de suero positivo de parvovirus, es una prueba relativamente económica y fácil de realizar, requiere de una fuente continua de eritrocitos de cerdo frescos y de alta calidad para su desarrollo, ya que la prueba se ve afectada por un coeficiente alterado de sedimentación eritrocitaria, lo que puede deberse a enfermedad de los donadores o estrés al momento del muestreo, (Buonavoglia, 2012). Las pruebas diagnósticas definitivas incluyen la detección de PVC en las heces de los perros afectados, serología, y la necropsia con histopatología. Los médicos veterinarios

pueden utilizar una técnica ya disponible en el consultorio, es un ensayo ligado a enzimas (ELISA) que sirve para demostrar PVC en las heces de los cachorros infectados. Partículas virales se eliminan en las heces del día 3 al 12 después de la infección, y son fácilmente detectables en el pico de excreción (4-7 días después de la infección (Prittie, 2004). Otros métodos incluyen, detectar antígeno de PVC en las heces, la microscopía electrónica y aislamiento viral. También se han diseñado ensayos que utilizan una cadena de la polimerasa de reacción (PCR) para detectar parvovirus en las heces. Las pruebas de PCR para parvovirus tienen sensibilidades más altas y especificidades que los métodos convencionales de antígeno viral determinación en heces (Prittie, 2004).

Coronavirus canino, puede diagnosticarse por medio de RT-PCR, suele ser altamente confiable, pero se debe contar con un control positivo y primers específicos para su realización (Movahziki, 2001). La ELISA es otro método utilizado en el diagnóstico de coronavirus canino, sin embargo, el aislamiento viral por microscopía electrónica aún se usa con frecuencia para determinar la presencia del patógeno (Tupler, 2012).

Para el diagnóstico de rotavirus se utiliza materia fecal de perros gastroentéricos, la mayor eliminación del virus se observa entre 3 y 5 días después de la infección y es raro detectar el agente después de los 8 días. La presencia del virus puede comprobarse en las heces por microscopía electrónica, RT-PCR y Rotoforesis con tinción de plata.

6. Justificación

Las co-infecciones de parvovirus con los algunos patógenos entéricos (coronavirus, rotavirus, *salmonella ssp.* pueden ocasionar la complicación de los cuadros clínicos. Rotavirus canino tiene reportes en diferentes partes del mundo, en México no se tienen datos de la presencia de esta enfermedad, a pesar de que existen datos de ser una zoonosis, no se conoce el comportamiento de la enfermedad, ni se cuenta con una vacuna preventiva. En el país se encuentra disponible la vacuna para coronavirus canino, pero no hay informes sobre la presencia de esta enfermedad.

7. Hipótesis

En perros del Estado de México se encuentran circulando rotavirus y coronavirus en asociación con parvovirus, produciendo cuadros gastrointestinales.

8. Objetivos

8.1 General

- Identificar si parvovirus, rotavirus y coronavirus están infectando a pacientes caninos con cuadros gastroentéricos.

8.2 Específicos

- Identificación molecular de parvovirus por PCR
- Identificación molecular de rotavirus por medio de RT-PCR

- Identificación de coronavirus canino por ELISA
- Identificar si existen co-infecciones entre parvovirus/rotavirus/ coronavirus y verificar si los pacientes presentan cuadros clínicos más severos.

9. Material y métodos

9.1 Colecta de muestras biológicas

El estudio se dividió en dos partes:

1) En la primera parte, se colectaron 29 hisopados rectales de perros que cursaban con síntomas gastroentéricos en el hospital veterinario de pequeñas especies de la UAEM, Toluca, durante el mes de noviembre del 2014 a enero del 2015.

Criterios de inclusión
Diferentes razas
Diferentes sexos
Sin vacunaciones
1 a 6 meses de edad
Casos clínicos de perros que presentaban gastroenteritis asociada a parvovirus.

De cada perro se tomó un hisopado rectal para la prueba de PCR (para identificación de Parvovirus), otro hisopado rectal fue tomado para realizar RT-PCR (para detectar rotavirus), también un hisopo con medio Stuart para la realización de un análisis bacteriológico, por último una muestra de sangre para realizar una ELISA como diagnóstico de coronavirus canino. Se centrifugaron las muestras de sangre para obtener el suero. Los hisopados y sueros fueron almacenados a -80°C hasta su procesamiento.

2) Los resultados de la primera parte de la investigación indicaron que el diagnóstico positivo para parvovirus y rotavirus fue predominante, por lo tanto; se colectaron 50 muestras de hisopos rectales en el hospital veterinario de pequeñas especies de la UAEM, Toluca, durante el mes de enero a marzo del 2015, contemplando los criterios de inclusión anteriormente mencionados, de cada perro se tomó un hisopado rectal para la prueba de PCR (para identificación de Parvovirus), otro hisopado rectal fue tomado para realizar RT-PCR (para detectar rotavirus).

9.2 Diagnóstico clínico

Cada perro fue examinado por un médico veterinario, realizando la historia clínica y el examen físico general para poder reportar los hallazgos encontrados se contó con un formato el cual incluía información general del paciente y signos clínicos presentados. (Anexo 1).

9.3 Extracción de DNA

Los hisopados rectales para la prueba de PCR (detección de parvovirus) se homogenizaron individualmente en viales estériles con 500µl de agua libre de nucleasas, se realizó agitación en vortex durante 30 segundos para homogenizar la muestra, la muestra era centrifugada a 8000 rpm durante 2 minutos y se utilizó solamente el sobrenadante. Posteriormente 200µl de este homogenizado se utilizaron para la purificación de DNA total, el procedimiento se realizó utilizando el kit QIAamp® DNA Stool (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 2). El DNA obtenido se conservó a -20°C hasta su uso.

Para la comprobación de contaminaciones dentro del proceso de extracción de DNA se realizó una purificación de agua como control negativo siguiendo los pasos establecidos en el kit.

9.4 Amplificación de PCR simple

100 ng de DNA de cada una de las muestras fueron utilizados para realizar la PCR; la reacción se realizó en un volumen final de 50 μ l.

Se diseñaron un par de primer para amplificar un fragmento de 275 pb:

Tabla 5. Primers para parvovirus canino

ParvoInt2FB	5'-TCAAGCAGATGGTGATCCAAG-3'
Int2CR	5'-GGTACATTATTTAATGCAGTTA-3'

Estos primeros están localizados en los nucleótidos 1107-1130 y 1360-1382 del gen VP2 (Número de acceso GenBank FJ0051962c).

Para la elaboración de esta reacción en un vial estéril de 200 μ l se colocaron los siguientes reactivos y componentes:

Tabla 6. Reactivos para PCR

Componentes	Volumen
GoTaq® Green Máster Mix	12.5 μ l
Iniciadores 20 μ M	2 μ l
Agua libre de nucleasas	28.5 μ l
Templado (100ng)	5 μ l
Volumen total	50 μ l

El reactivo GoTaq® Green Máster Mix (Promega, USA), contiene la enzima DNA polimerasa, reacción Buffer (pH 8.5) y 400µM de cada nucleótido dATP, dGTP, dCTP, dTTP y 3mM de MgCl₂.

Los viales fueron colocados en un termociclador Eppendorf®. Las reacciones de PCR fueron realizadas bajo las siguientes condiciones de amplificación:

- ✓ 1 ciclo de 94°C por 5 minutos
- ✓ 35 ciclos de 94°C por 30 segundos
- ✓ 52°C por 1 minuto
- ✓ 72°C por 1 minuto
- ✓ 1 ciclo de extensión final de 72°C por 5 minutos.

Los amplicones obtenidos fueron identificados por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio (0,5 mg / ml) y después visualizado en un transiluminador UV Bio-Imaging Systems Mini Bis Pro.

9.5 Extracción de RNA

Para el diagnóstico de rotavirus cada hisopado fue suspendido en 300 ul de agua inyectable para realizar la extracción del RNA, estos fueron centrifugados a 8000 rvpm, durante 1 min, solo 200 ul del sobrenadante fueron procesados para la extracción de RNA, utilizando el kit GeneJET Viral DNA and RNA Purification de Thermo scientific y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la comprobación de contaminaciones dentro del proceso de extracción de RNA se realizó una purificación de agua como control negativo siguiendo los pasos establecidos del kit.

9.6 Amplificación de RT-PCR

La RT-PCR de dos pasos, fue realizada para cada una de las muestras utilizando el kit ImProm-II™ Reverse Transcription System de promega, en el primer paso se obtuvo la síntesis de cDNA; se utilizaron 3 ul de RNA de cada una de las muestras más 2 ul de Primer (Oligo dT) (0.5µg/reaction) la reacción fue incubada a 70°C y posteriormente a 4 °C durante 5 minutos, enseguida se agregó 1 ul de ImProm-II™ Reverse Transcriptase (1u/µl), 1 ul de dNTP Mix (final concentration 0.5mM each dNTP), 4.6 ul de MgCl₂ (final concentration 1.5–8.0mM)¹ 4 ul de ImProm-II™ 5X Reaction Buffer, 0.5ul de Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (2,500u) y 3.9 de agua libre de nucleasas, la reacción final fue de un volumen total de 20 ul. Todas las reacciones fueron incubadas posteriormente a 25°C por 5 minutos, seguido de 42°C por 80 minutos, 70°C por 15 minutos y 4°C por 5 minutos.

La PCR, se realizó utilizando 3ul de cDNA, en una reacción de 25 ul. volumen final; para esto, previamente se diseñaron un par de primer degenerados para amplificar un fragmento de 379 pb:

Tabla 7. Primers RT-PCR para rotavirus canino

VP6F	5´-GACGGVGCRACTACATGGT -3´
VP6R	5´-GTCCAATTCATNCCTGGTGG- 3´

Estos iniciadores se encuentran localizados en los nucleótidos 750-769 y 920-939 del gen VP6 (Número de acceso GenBank KJ940164.1).

Para la elaboración de esta reacción en un vial estéril de 200µl se colocaron los siguientes reactivos y componentes:

Tabla 8. Reactivos RT-PCR

Componentes	Volumen
Green buffer	5 µl
Iniciadores 20µM	1.5µl
Agua libre de nucleasas	10.2µl
Templado (100ng)	3µl
dNTP´S	1µl
Taq	0.3µl
MgCl2	2.5µl

Todas las reacciones fueron realizadas bajo las siguientes condiciones de amplificación:

- ✓ 1 ciclo de 94°C por 5 minutos
- ✓ 35 ciclos de 94°C por 1 minuto
- ✓ 61°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos
- ✓ 1 ciclo de extensión final de 72°C por 5 minutos.

Los amplicones obtenidos fueron identificados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio (0,5 mg / ml) y después fue visualizado en un transiluminador UV Bio-Imaging Systems Mini Bis Pro.

Para verificar la especificidad de los primers, los amplicones de los controles positivos fueron secuenciados. El procedimiento de secuenciación se realizó de la siguiente manera: los productos de PCR se purificaron a partir del gel de agarosa, utilizando el Wizard® SV Gel y PCR Clean -Up System (Promega, EE.UU.). 30 ng del producto de PCR purificado se sometió al análisis de secuenciación utilizando Dye® Terminator v.3.1 Ciclo de Secuenciación Kit (Applied Biosystems, EE.UU.). Las secuencias se procesaron en un analizador de secuencia 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Se analizaron las reacciones de secuenciación en una PRISM® 3130xl ABI (Applied Biosystems, EE.UU.) las secuencias obtenidas fueron alineadas con secuencias reportadas con números de acceso al GenBank en el caso de rotavirus (GU565078.1), (JX866792.1) y en el caso de parvovirus (KP682524.1) utilizando ClustalW Software.

10. Coronavirus canino (ELISA)

Para la realización de la prueba de ELISA se utilizó el kit DRG® Canine Corona Virus IgG ELISA siguiendo el protocolo del test, se reconstituyeron antes de utilizar el control negativo y positivo en 1 ml y 0,5 ml (respectivamente) de agua deionizada, se hicieron alícuotas e inmediatamente se almacenaron a -20 ° C hasta su uso. Después se colocó 50 ul de cada uno de los 39 sueros en los pozos de la placa y 100 ul del control positivo y negativo, después se encubaron a 37°C por 60 minutos. Posteriormente se lavó la placa, según protocolo de lavado. Se Dispensó 100 ul de conjugado a todos los pocillos, se selló y se incubó durante 60 min. a 37 ° C. Se lavó la placa nuevamente según el protocolo de lavado. Consecutivamente se mezcló partes iguales de Bufferr A y buffer B con agitación suave. Se Dispensaron 100 ul de solución de sustrato a cada pocillo y se Incubo 10-15 min. a temperatura ambiente (21 ° C). Por último se añadieron 50 ul de solución stop a cada pocillo, y realizo la lectura de los valores de absorbancia de inmediato (dentro de 10 min.) A 450 nm. Después de este procedimiento se obtuvieron 8 muestras reactivas a coronavirus canino y se continuó con la realización de la segunda parte del kit, se hicieron 3 diluciones de cada una de las muestras reactivas en buffer ELISA, a partir de 1:30, 90,270. Se realizaron también 3 diluciones del control positivo y del control negativo. Después se transfirieron 100 ul de estas diluciones a la placa con las tiras de microtitulación recubiertas con CCV. Se sellaron y se incubaron durante 60 min. a 37 ° C. Posteriormente se lavó la placa según el protocolo de lavado. Se Dispensaron 100 ul de conjugado a todos los pocillos, se

selló y se incubó 60 min. a 37 ° C. Se realizó otro lavado según el protocolo. Se mezcló en partes iguales el buffer A y el buffer B con agitación suave. Se dispensaron 100 ul de solución de sustrato a cada pocillo. Se incubó de 10-15 min. a temperatura ambiente (21 ° C) y se agregó 50 ul de la solución de stop a cada pocillo; mezclando bien. Posteriormente se leyeron los valores de absorbancia dentro de los 10 min como máximo A 450 nm, para obtener que la titulación 1: 30 es sin presencia de anticuerpos, un título de 1:90-270 tiene anticuerpos medios, mayores de 1:810 son considerados anticuerpos altos.

11. Salmonella ssp.

El hisopo con medio Stuart fue utilizado para el aislamiento de enterobacterias a partir de hisopados rectales de perros, se utilizó el método francés (estría compuesta); Se flamea el asa y se toma la muestra del material a estudiar, colocando la muestra con el hisopo en uno de los extremos de la caja de petri con el medio de cultivo indicado. Se extendió el cultivo haciendo 4 o 5 estrías paralelas, sin romper el agar, posteriormente se flameo de nuevo el asa enfríela y sin tomar más muestra, haciendo 4 o 5 estrías paralelas formando un ángulo recto con respecto a las anteriores. Este paso se repite hasta cubrir toda el área de la caja.

Se sembraron las muestras de los hisopados rectales en medios enriquecidos (agar sangre con 5% de sangre de cordero), selectivos (McConkey), medios selectivos y

diferenciales (Salmonella, verde brillante altamente selectivo para *Salmonella* sp.), para posteriormente ser incubadas a 37.5 °C durante 24 horas, finalizada la incubación se procedió a revisar cada una de las placas para hacer una identificación morfológica de cada una de las colonias aisladas, en los diferentes medios utilizados; se realizó un pase para purificar los aislados en los diferentes tipos de medios antes mencionados.

Los aislados se identificaron mediante la inoculación de las bioquímicas: agar triple hierro (TSI), agar citrato de Simmons (SIM), MIO y UREA; una vez inoculada la batería de bioquímicas se incubo a 37.5 °C durante 24 horas.

El resultado se emitió posterior a la lectura de las bioquímicas.

12. Resultados

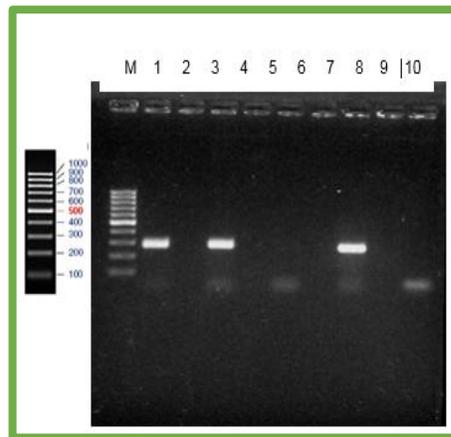
En este estudio reportamos por primera vez que rotavirus canino se encuentra circulando entre la población de perros de una región de México, se observó asociado con el patógeno más frecuente que es parvovirus pero también se encontró en otras asociaciones mixtas con coronavirus. Cumpliendo nuestra hipótesis inicial que decía que en perros del Estado de México se encuentran circulando rotavirus y coronavirus en asociación con parvovirus, produciendo cuadros gastrointestinales.

En la parte 1 del trabajo se obtuvieron los siguientes resultados: de 29 perros, 11 fueron positivos a parvovirus canino por el método de PCR simple, 9 fueron positivos a rotavirus canino por el método de RT-PCR, 6 fueron reactivos a coronavirus canino por el método de ELISA indirecta (Gráfica 1) y 3 fueron positivos a *salmonella* *ssp.* por análisis bacteriológico. Los porcentajes se presentan en la gráfica 2.

12.1 PCR simple (Parvovirus)

Se obtuvieron amplificaciones de 275 pb utilizando los iniciadores ParvoINT2FB y Parvo INT2CR (Figura 10).

Figura 10. Gel de agarosa 2X PCR simple

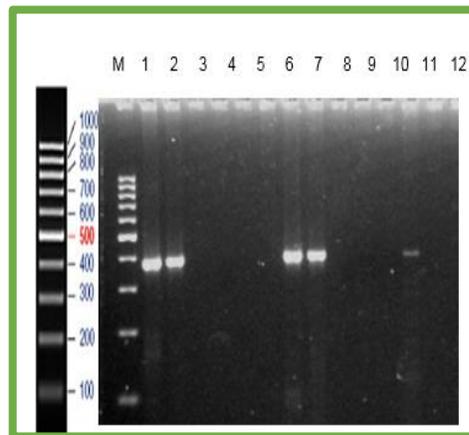


Como se puede observar en el gel de agarosa 2X PCR simple el carril M: Marcador, carril 1 y 3 se observa la amplificación del fragmento de 2795 pb. De muestras positivas a parvovirus canino, carril 5 muestra negativa, carril 8 control positivo (vacuna), carril 10 control negativo (agua).

12.2 RT-PCR (Rotavirus)

Se obtuvieron amplificaciones de 379pb utilizando los iniciadores degenerados VP6F y VP6R (Figura 11)

Figura 11. Gel de agarosa 1.5X PCR simple

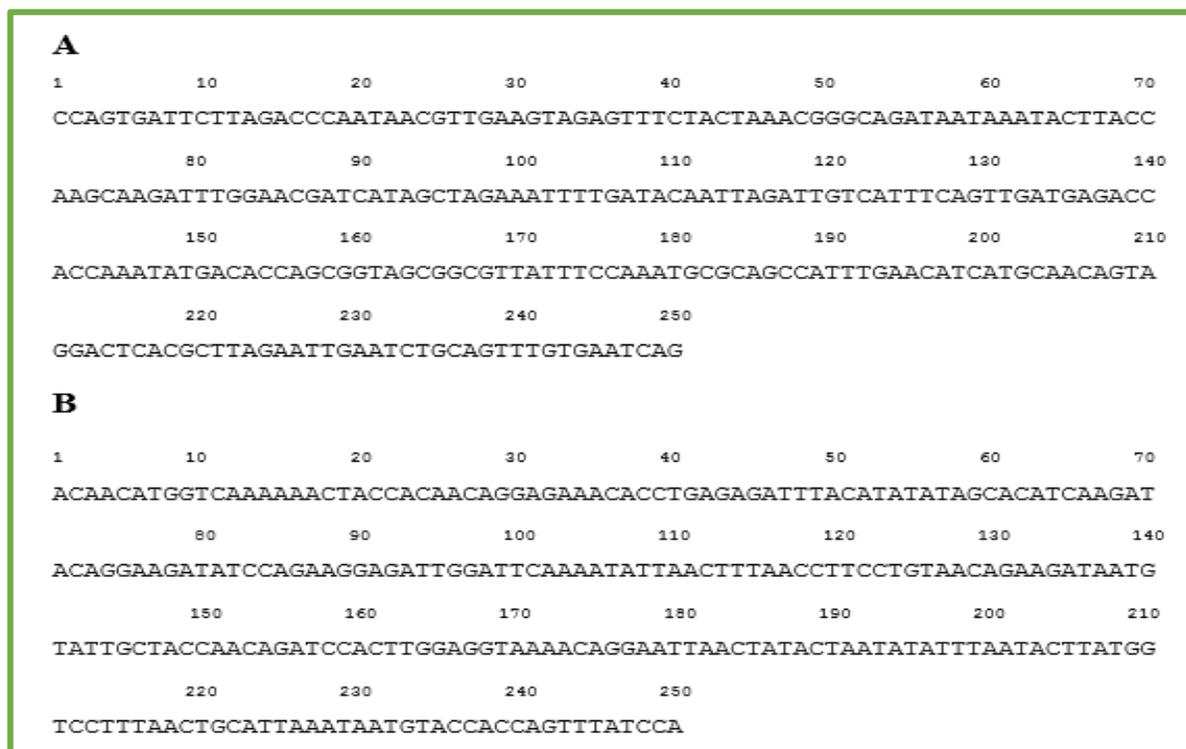


En esta figura se observa el gel de agarosa 1.5X RT-PCR, nótese que en los carriles M: marcador, 1, 2, 6, 7 y 10 se observa la amplificación del fragmento de 379 pb.

12.3 Secuenciación

Nuestras secuencias coinciden al 100% con las secuencias de referencia (Figura 12), lo que indica que los cebadores utilizados para la PCR y RT-PCR en este trabajo, son específicos para la amplificación del genoma de ambos virus.

Figura 12. Secuenciación



Los 250 nucleótidos secuenciados a partir de los fragmentos amplificados de muestras de rotavirus canino; las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias reportadas en genbank: GU565078.1, JX866792.1. EU708927.1 B) Los 250 nucleótidos secuenciados a partir de los fragmentos amplificados de

muestras parvovirus canino; Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias reportadas en GenBank: KP694306.1 , KP694305.1 , KP694304.1 .

12.4 ELISA

Utilizando el kit rápido DRG® Canine Corona Virus IgG ELISA se obtuvo un total de 6 muestras reactivas a coronavirus canino en suero. Porcentajes se presentan en la gráfica 1. Utilizando como referencia que un valor mayor a 250 unidades de DO, se consideró como muestra reactiva para coronavirus canino, las muestras reactivas se encontraron con una titulación de anticuerpos de 270, lo que significa que están dentro de valores e anticuerpos medios (Tabla 9).

Gráfica 1 resultados de la ELISA INDIRECTA

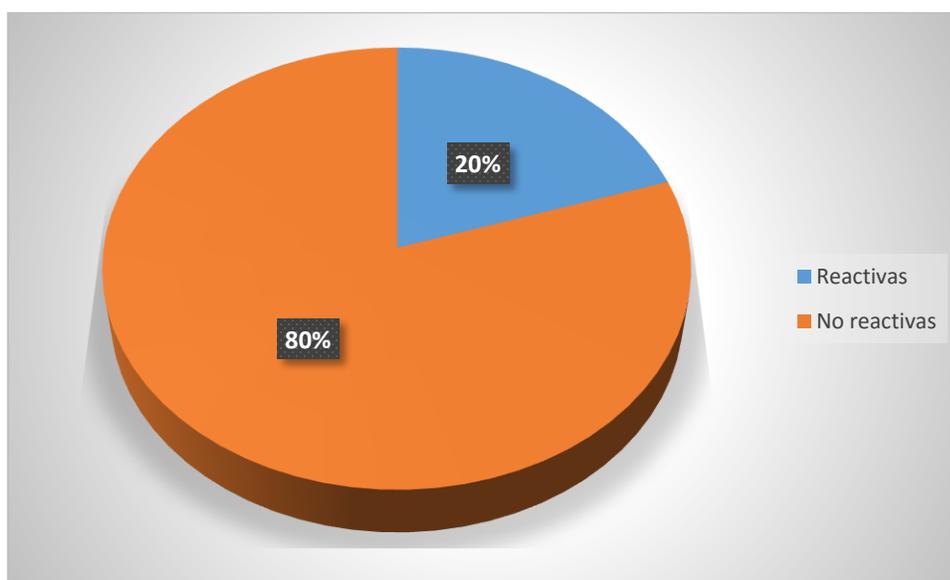
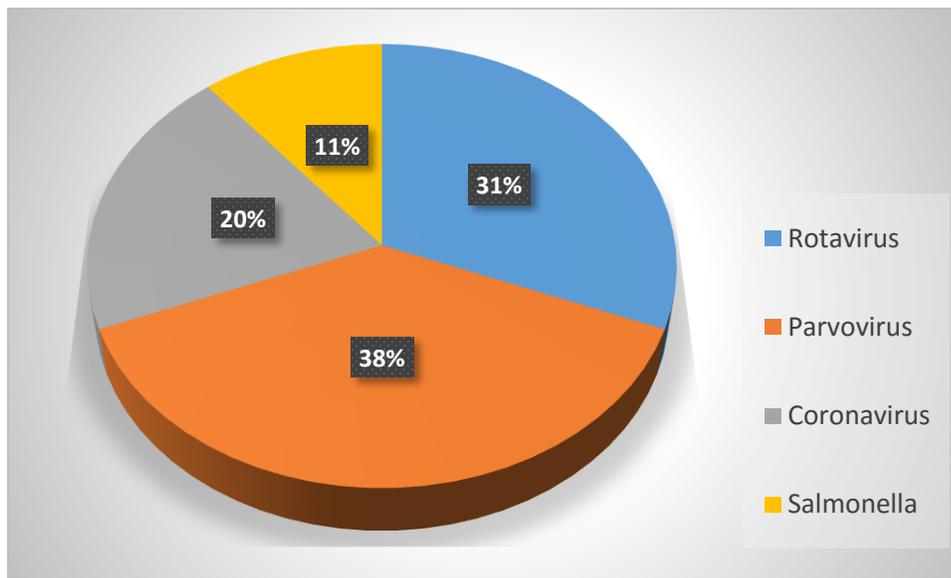


Tabla 9. Titulación de anticuerpos

Titulo 30	Sin anticuerpos
Titulo 1:90-270	Anticuerpos medios
Título 1:810	Anticuerpos altos

Gráfica 2 Resultados de panel gastroentérico



Parvovirus con un 38% y coronavirus con un 31% fueron los patógenos que se diagnosticaron con más frecuencia en una muestra de 29 perros.

En la parte 2 de la investigación se hizo el diagnóstico a 50 perros, solamente para parvovirus y rotavirus, debido a que fueron los patógenos que se encontraron con mayor presencia en la parte de este estudio. Los resultados arrojados fueron los siguientes: De los 50 perros, 82% (45/50) fueron positivos para al menos uno de los dos virus, específicamente, 60% (27/45) fueron positivas solamente para parvovirus, 8% (7/45) fueron positivas sólo para el rotavirus y el 14% (11/45) fueron co-infectados. Cinco muestras no fueron positivas, ya sea para el parvovirus o rotavirus. Los porcentajes se muestran en la gráfica 5.

Gráfica 3 Presencia de virus

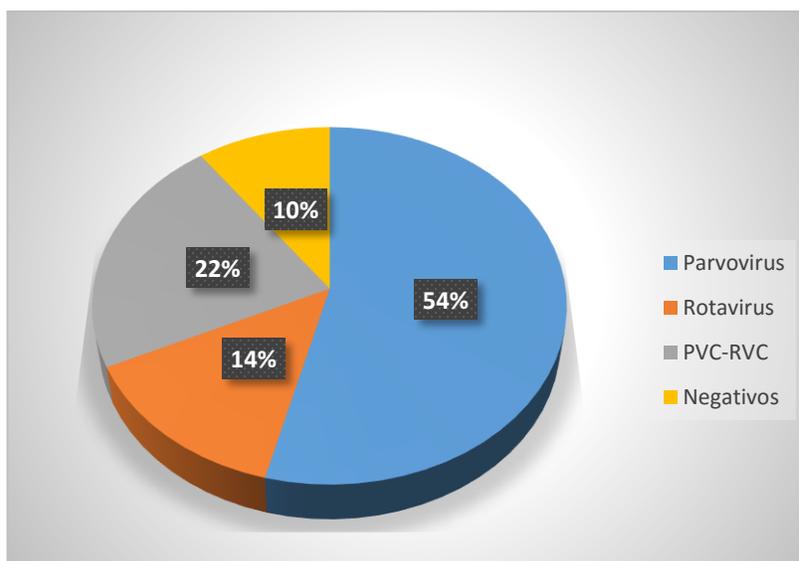
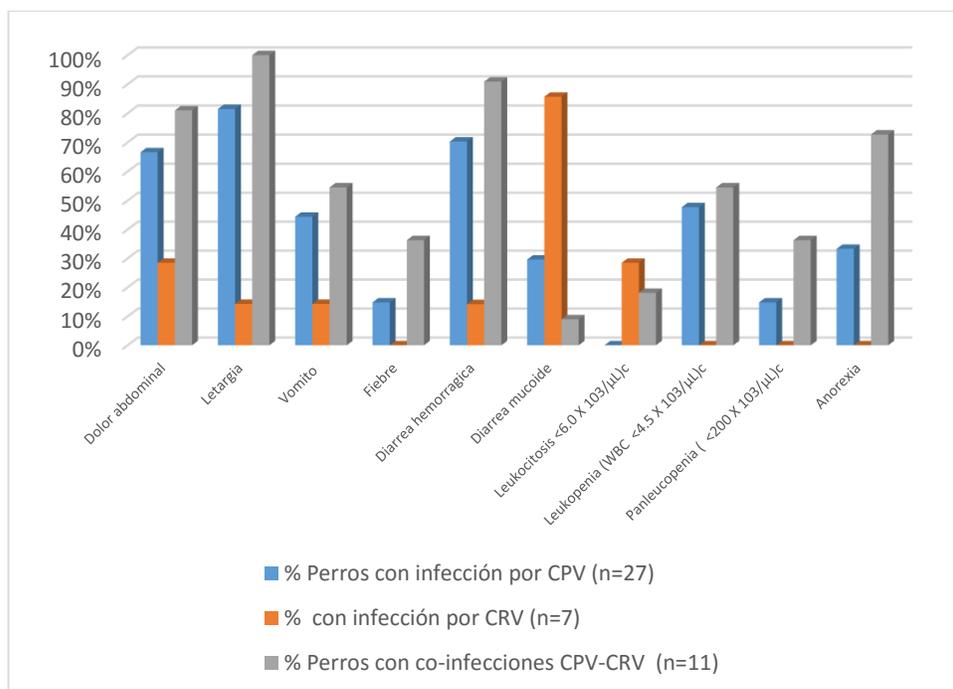


Tabla 10. Signología clínica rotavirus, parvovirus y asociaciones

Signos clínicos , examinación física, resultados de laboratorio en pacientes con enteritis	% Perros con infección por CPV (n=27)	% con infección por CRV (n=7)	% Perros con co-infecciones CPV-CRV (n=11)
Dolor abdominal	66.60%	28.50%	81.00%
Letargia	81.48%	14.28%	100%
Vomito	44.40%	14.28%	54.50%
Fiebre	14.81%	0	36.30%
Diarrea hemorrágica	70.30%	14.20%	90.90%
Diarrea mucoide	29.60%	85.70%	9.00%
Leukocitosis <math><6.0 \times 10^3/\mu\text{L}</math>c	0	28.50%	18.10%
Leukopenia (WBC <math><4.5 \times 10^3/\mu\text{L}</math>c	47.70%	0	54.50%
Panleucopenia (<math><200 \times 10^3/\mu\text{L}</math>c	14.80%	0	36.30%
Anorexia	33.30%	0	72.70%

Gráfica 4 Signos clínicos de perros infectados con parvovirus, rotavirus y co-infección parvo-rotav.



1 **13. Artículo enviado**

Canadian Journal of Veterinary Research



Identification of co-infection by rotavirus and parvovirus in dogs with gastroenteritis in Mexico

Journal:	Canadian Journal of Veterinary Research
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Short Communications
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Flores, Ariadna; Universidad Autonoma del estado de Mexico, Facultad de medicina veterinaria y zootecnia Martinez Castañeda, Simon; Universidad Autonoma del estado de Mexico, Facultad de medicina veterinaria y zootecnia Fajardo, Raul; Universidad Autonoma del estado de Mexico, Facultad de medicina veterinaria y zootecnia Bautizta, Linda; Universidad Autonoma del estado de Mexico, Centro Universitario Amecameca Romero, Camilo; Universidad Autonoma del estado de Mexico, Centro Universitario Amecameca
Keyword:	Rotavirus, Parvovirus, canine, Mexico
Abstract:	Whilst canine parvovirus is the most important pathogenic agent in canine gastroenteritis due to its morbidity and mortality, canine rotavirus has a minor importance for veterinarians because this virus does not produce high mortality in dog populations. In Mexico it is unknown whether canine rotavirus circulates in canine populations and its role in dog gastroenteritis. In the present study we analyzed 50 samples from dogs with gastroenteritis, for this purpose, were used PCR and RT-PCR in order to identify parvovirus and rotavirus, respectively. This is the first report on circulating rotavirus in the State of Mexico; 7% of dogs were found to be infected with rotavirus exclusively, while 14% were co-infected with both rotavirus and parvovirus; clinical signs in co-infected dogs were more severe than in those infected with some of these pathogens. The present study highlights the pathogenicity of rotavirus when associated to gastroenteritis caused by parvovirus.

SCHOLARONE™
Manuscripts

<https://mc06.manuscriptcentral.com/cjvr-pubs>

2

3

4

5

6

7 Identification of co-infection by rotavirus and parvovirus in dogs with gastroenteritis in Mexico

8 Ariadna Flores¹, Simón Martínez^{1*}, Raúl Fajardo¹ Linda Bautista², Camilo Romero²

9 ¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria
10 y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca- Atlacomulco Km.
11 15.5 Toluca, Estado de México C.P. 50200.

12 ²Centro Universitario Amecameca. Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera
13 Amecameca Ayapango Km. 2.5 Amecameca de Juárez C.P. 56900.

14 *jsmc@uaemex.mx

15 ABSTRACT

16 Whilst canine parvovirus is the most important pathogenic agent in canine gastroenteritis due to its
17 morbidity and mortality, canine rotavirus has a minor importance for veterinarians because this virus
18 does not produce high mortality in dog populations. In Mexico it is unknown whether canine
19 rotavirus circulates in canine populations and its role in dog gastroenteritis. In the present study we
20 analyzed 50 samples from dogs with gastroenteritis, for this purpose, were used PCR and RT-PCR
21 in order to identify parvovirus and rotavirus, respectively. This is the first report on circulating
22 rotavirus in the State of Mexico; 7% of dogs were found to be infected with rotavirus exclusively,
23 while 14% were co-infected with both rotavirus and parvovirus; clinical signs in co-infected dogs
24 were more severe than in those infected with some of these pathogens. The present study highlights
25 the pathogenicity of rotavirus when associated to gastroenteritis caused by parvovirus.

26 Key words: Rotavirus, Parvovirus, canine, Mexico

27 Infectious gastroenteritis are one of the main causes of dog hospitalization, etiological agents
28 identification is a challenge for veterinarians, given that gastroenteritis' etiology is caused by
29 diverse pathogenic agents, mainly co-infections among virus or bacteria (Yesilbag, 2008; Gizzi,
30 2014).

31 Diverse reports indicate that canine parvovirus (PVC-2) is the most diagnosed viral agent in
32 gastroenteritis (Mochizuki, 2001; Perez, 2014). Actually PVC-2 has three genetic variants, PVC-2a,
33 PVC-2b and PVC-2c, it is possible that PVC2c is the predominant variant in numerous countries
34 (Decaro, 2007), for example, a study in Mexico proved that the main variant is CPV-2c (Roldan,
35 2015).

36 Currently, there is some controversy over clinical characteristics of disease associated with these
37 three variants; several authors suggest there are none, while other authors disagree (Prittie, 2004).

38 Clinical signs of canine parvovirus include fever, anorexia, lethargy, depression, vomiting, mucoid
39 to hemorrhagic diarrhea and sometimes leukopenia; however, some reports show parvovirus in dogs
40 with atypical clinical signs, and the authors suggest that this is likely due to CPV-2 evolution. On
41 the other hand, the disease can vary depending on the patient; actually, CPV-2c can infect both pups
42 and adults (Lamm, 2008).

43 A further factor implicated in variability of clinical profiles in parvovirus is association with other
44 gastroenteric viruses such as canine distemper, canine coronavirus and canine rotavirus.

45 Canine rotavirus is an RNA virus that possesses a segmented genome (Pedroza, 2015), its clinical
46 signs include mild enteritis, mainly in pups under two weeks old (Kang, 2007), it also causes
47 lethargy, anorexia, fever, diarrhea and vomit. Generally, patients recover within 2 weeks, however,
48 there are reports of fatal severe enteritis in dogs under two weeks old (Tupler, 2012).

49 The presence of antibodies against rotavirus has been demonstrated in a high percentage of adult
50 dogs (80%) (Bahman, 2015). The rotavirus doesn't have pathognomonic clinical signs and most
51 dogs can be asymptomatic to infection and occasionally the signs can be confused with parvovirus,
52 therefore, laboratory test for differential diagnoses are necessary (Hoskins, 2006), (Martella, 2001),
53 (Rimmelzwa, 1991).

54 In Mexico it remains unknown whether rotavirus is circulating amongst canine populations and if it
55 plays a primary role as etiologic agent in gastroenteritis.

56 From March through June 2015, we conducted non-probability sampling (according to
57 Rimmelzwaan, 1991) in dogs attending the small animal veterinary hospital of the Autonomous
58 University of the State of Mexico (UAEM, by its acronym in Spanish).

59 We selected dogs between 1 to 6 months of age, of different breeds, non-vaccinated all of which
60 displayed gastroenteritis. Under these conditions, we sampled a total of 50 dogs; one rectal swab was
61 taken from each dog to be used in PCR testing (parvovirus identification), while a second swab was
62 taken for RT-PCR testing (rotavirus identification). Swabs were stored at -80°C until processing.

63 The Rotateq vaccine, which contains rotavirus serotypes G1, G2, G3 and P1A, was used as positive
64 control, and in the case of parvovirus we used the Edo. Mex 1 isolate (previously identified in our
65 laboratory and which corresponds to parvovirus 2-C genotype).

66 In order to extract RNA from rotavirus, each swab was suspended in 200 µl of sterile water and
67 centrifuged at 8000 rpm x 1 minute; supernatant was processed using the GeneJET Viral DNA and
68 RNA Purification kit (Thermoscientific), following manufacturer's instructions.

69 Rectal swabs used for parvovirus detection were suspended in 500 µl of sterile water, centrifuged at
70 8000 rpm x 1 minute, 200 µl of supernatant were processed for DNA extraction using the QIAamp
71 DNA Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions.

72 In the case of rotavirus, two-step RT-PCR was performed for each of the samples, using the
73 ImProm-II™ Reverse Transcription System kit (Promega). In the first step, cDNA synthesis was
74 accomplished. We used 3 µl of RNA of each purification and 2 µl (0.5µg/reaction) of primer dT.
75 The reaction was incubated at 70°C for 15 minutes and subsequently at 4°C for 5 minutes. Next, 1
76 µl of ImProm-II™ Reverse Transcriptase (1u/µl) was added, as well as 1 µl dNTP Mix (final
77 concentration 0.5mM each dNTP), 4.6 µl MgCl₂ (final concentration 1.5mM), 4 µl ImProm-II™ 5X
78 Reaction Buffer, 0.5 µl Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (2,500 µ) and 3.9 µ
79 nuclease-free water to reach a final volume of 15 µl.

80 PCR was performed using the primers VP6F (5'-GACGGVGCRACTACATGGT -3') and VP6R
81 (5'-GTCCAATTCATNCCTGGTGG- 3') designed to amplify a 379bp fragment of VP6 gene
82 (GenBank accession number KJ940164.1); these primers are located in the nucleotides 750 to 769
83 and 920 to 939 respectively. The reaction was performed using 1.5µl of both primers at a 20 µmol

84 concentration plus 3 µl of cDNA, 5 µl of GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) reaction
85 buffer (pH 8.5) containing 400µM of each nucleotide dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 2.5 µl of MgCl₂
86 and 0.5 µl of taq polymerase. The reaction included 11 µl of nuclease-free water to reach a final
87 volume of 25 µl.

88 All reactions were performed under the following conditions: 1 cycle at 94°C 5 min, followed by 35
89 cycles at 94°C 1 min, 61°C 1 min, 72°C for 2 min and a final extension 72°C 5 min. Amplicons were
90 loaded in a 1.5% agarose gel (stained with 0.5mg/ml of ethidium bromide) and visualized by means
91 of a UV Bio-Imaging Systems Mini Bis Pro transilluminator (Fig 1).

92 In the case of Parvovirus, 100 ng of DNA from each sample were used for PCR. Previously, we
93 designed a pair of primers: ParvoInt2FB (5'-TCAAGCAGATGGTGATCCAAG-3') and
94 ParvoInt2CR (5'-GGTACATTATTTAATGCAGTTA-3') to amplify a 275 bp fragment of the VP2
95 gene fragment. These primers are located between nucleotides 1107 - 1130 and 1360 - 1382 of the
96 gene sequence (GenBank accession number FJ0051962c). Reactions contained 2µl of both primers at
97 a 20µM concentration, plus 12.5µl of GoTaq® Green Máster Mix (Promega, USA) containing the
98 enzyme DNA polymerase, reaction buffer (pH 8.5), 400µM of each nucleotide dATP, dGTP, dCTP,
99 dTTP and 3 mM MgCl₂. We added 28.5µl of nuclease-free water to obtain a final volume of 50 µl.

100 The following conditions were used in all PCR reactions: one cycle at 94°C for 5 min, 35 cycles at
101 94°C for 30 seconds, 52°C for 1 min, 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 5 min. The
102 electrophoresis of amplicons was achieved in a 2% agarose gel (stained with 0.5mg/ml ethidium
103 bromide) and visualized in a UV Bio-Imaging Systems Mini Bis Pro transilluminator (Figure 1).

104 In order to verify primer specificity, amplicons from positive controls were sequenced. Sequencing
105 was accomplished through the following procedure: first, PCR products were purified from agarose
106 gel using the Wizard® SV Gel and PCR Clean -Up System (Promega, EE.UU.). Next, 30 ng of
107 purified PCR product were sequenced by means of the Dye® Terminator v.3.1 Sequencing Kit
108 (Applied Biosystems, EE.UU.). Sequences were processed in a 3100 sequence analyzer (Applied
109 Biosystems, Foster City, CA, EE.UU) and reaction sequences were analyzed in a PRISM® 3130xl
110 ABI analyzer (Applied Biosystems, EE.UU.).

111 After removing primer-derived sequences and some sequences with inconsistencies at the 5' and
112 3' ends, we obtained 250-nucleotide-long final sequences which were compared to sequences
113 available in GenBank by means of ClustalW Software. Specifically, sequences with accession
114 numbers: GU565078.1 and JX866792.1 for rotavirus, and KP682524.1 for parvovirus.

115 Our sequences matched 100% with the reference sequences (Fig 2), which indicates that primers
116 used for PCR and RT-PCR in this study, are specific for genome amplification of both viruses.
117 Therefore, the analysis of all samples was accomplished using this protocol. Out of 50 dogs, 82%
118 (45/50) were positive for at least one of the two viruses, specifically, 60% (27/45) were positive
119 only for parvovirus, 8% (7/45) were positive only for rotavirus and 14% (11/45) were co-infected.
120 Five samples, which were not positive for either parvovirus or rotavirus, were positive for canine
121 distemper and *Salmonella spp.* (data not shown).

122 As a general observation, the clinical signs of rotavirus were milder than those of parvovirus; dogs
123 infected with rotavirus exclusively, displayed abdominal pain, lethargy, vomiting, mucoid diarrhea
124 and in some cases leukocytosis. However, in the co-infected dogs we observed severe gastroenteric
125 symptoms in addition to leukopenia, panleukopenia, mucoid or hemorrhagic diarrhea, vomiting and

126 lethargy. These symptoms were even more severe than those observed in dogs infected with only
127 parvovirus (Table 1).

128 Data from the present study were compared to previous studies, and our results show a relatively
129 high percentage of dogs with co-infection (14%) in relation to findings in other countries, for
130 instance 2.4% has been reported in U.S.A., as inferred from reverse passive haemagglutination
131 (RPHA), in Japan, 1.2% was estimated from viral isolation and 2% using electron microscopy,
132 while in Italy there were no identifications using PAGE (Tupler, 2012, Mochizuki, 2001, Yesilbag,
133 2008). We consider low percentages might be related to the techniques employed in these studies,
134 in this sense, in the present study we used RT-PCR which has demonstrated increased sensitivity
135 (Kanter, 2015). It is also possible that contrasting results are influenced by the country where
136 studies were conducted, as it is well documented that different rotavirus genotypes are associated
137 with low-income areas. Furthermore, other studies have reported the presence of rotavirus only in
138 pups under two months of age or newborns (Martella, 2001), however, here we detected rotavirus
139 infection in dogs over 6 months of age.

140 Our report is the first study demonstrating the presence of circulating rotavirus in dogs from the
141 State of Mexico. Although rotavirus is of little importance for veterinarians as it has low mortality
142 rate, in the present study we observed it plays an important role in severity of viral gastroenteritis,
143 especially when associated to canine parvovirus. On the other hand, although parvovirus is
144 considered the most important pathogen in canine gastroenteritis, rotavirus is of special interest to
145 public health due to its zoonotic potential. In support of this, there exist reports of inter-species
146 transmission of canine rotavirus of the G3 group to children in Italy and Taiwan (Lunchs, 2012).

147 Although this is the first report of rotavirus in canines of the State of Mexico, future molecular
148 epidemiology studies should be conducted to identify the circulating genotypes in dog populations
149 throughout Mexico, as this will increase our understanding on the importance of rotavirus in dogs

150 **References**

- 151 1. Yeşilbağ K, Yılmaz Z, Ozkul A, Pratelli A. Aetiological Yeşilbağ K, Yılmaz Z, Ozkul A, Pratelli
152 A. Aetiological role of viruses in puppies with diarrhoea. *Vet Rec.* 2008; 4:161(5) 169-70
- 153 2. Gizzi AB, Oliveira ST, Leutenegger CM, Estrada M, Kozemjak DA, Stedile R, Marcondes M,
154 Biondo AW. Presence of infectious agents and co-infections in diarrheic dogs determined with a
155 real-time polymerase chain reaction-based panel. *BMC Vet Res.* 2014; 16:10:23
- 156 3. Mochizuki M, Hashimoto M, Ishida T. Epidemiological status of canine viral enteric infections
157 and giardia infection in Japan. *J Vet Med Sci.* 2001; 63(5):573-5
- 158 4. Pérez R, Calleros L, Marandino A, Sarute N, Iraola G, Grecco S, Blanc H, Vignuzzi M, Isakov
159 O, Shomron N, Carrau L, Hernández M, Francia L, Sosa K, Tomás G, Panzera Y. Phylogenetic and
160 Genome-Wide Deep-Sequencing Analyses of Canine Parvovirus Reveal Co-Infection with Field
161 Variants and Emergence of a Recent Recombinant Strain. *Plos one.* 2014; 9:11
- 162 5. Decaro N, Martella V, Elia G, Desario C, Campolo M, Lorusso E, Colaianni L, Lorusso E,
163 Buonavoglia C. Tissue distribution of the antigenic variants of canine parvovirus type 2 in dogs.
164 *Vet Microbiol.* 2008; 121:39-44.
- 165 6. Prittie J, Canine parvoviral enteritis: a review of 162 diagnosis, management, and prevention. *J*
166 *Vet Emerg Crit Care.* 2004; 14(3):167-176

- 167 7. Lamm CG, Rezabek GB. Parvovirus infection in domestic companion animals. *Vet Clin North*
168 *Am Small Anim Pract.* 2008; 38(4):837-50
- 169 8. Pedroza RC, Páez MV, Charles NC, Elizondo QD, Leonel MR, López MA. Genotyping
170 of Canine parvovirus in western Mexico. *J Vet Diagn Invest.* 2015; 27(1):107-11
- 171 9. Kang BK, Song DS, Jung KI, Lee CS, Park SJ, Oh JS, An DJ, Yang JS, Moon HJ, Lee SS, Yoon
172 YD, Park BK. Genetic characterization of canine rotavirus isolated from a puppy in Korea and
173 experimental reproduction of disease. *J Vet Diagn Invest.* 2007; 19(1):78-83
- 174 10. Tupler T, Julie K, Stephanie J, Sylvia J, Ellis C, Christian M. enteropathogens identified in dogs
175 entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea. *J Am Vet Med Assoc.* 2012; 241(3):
176 338-343
- 177 11. Bahman M, Masoud R, Seyfiabad S, Reza A, Mahdi P. Antigenic detection of Canine rotavirus
178 group A in diarrheic dogs in Ahvaz district, Southwestern Iran. *Comparative Clinical Pathology.*
179 2014; 24 (4): 899-902
- 180 12. Hoskins DJ. Canine Viral Enteritis. In: *Infectious Diseases of the Dogs and Cats.* Greene, C.E.
181 3rd ed. W.B. Saunders Co, Philadelphia: 2006:40-4
- 182 13. Martella V, Pratelli A, Elia G, Decaro N, Tempesta M, Buonavoglia C. Isolation and genetic
183 characterization of two G3P5A[3] canine rotavirus strains in Italy. *J Virol Methods.* 2001; 96(1):43-
184 9.
- 185 14. Rimmelzwaan GF, Groen J, Egberink H, Borst GH, UytdeHaag FG, Osterhaus AD. The use of
186 enzyme-linked immunosorbent assay systems for serology and antigen detection in parvovirus,
187 coronavirus and rotavirus infections in dogs in the Netherlands. *Vet Microbiol.* 1991; 26(1-2):25-40
- 188 15. Kantere MC, Athanasiou LV, Spyrou V, Kyriakis CS, Kontos V, Chatzopoulos DC, Tsokana
189 CN, Villinis C. Diagnostic performance of a rapid in-clinic test for the detection of canine
190 parvovirus under different storage conditions and vaccinations status. *J virol Methods.* 2015; 216:52
- 191 16. Lunchs A, Cilli A, Morillo SG, Carmona C, Timenestky C. Rare G3P rotavirus strain detected
192 191 in Brazil: possible human- canine interspecies transmission
- 193
- 194 Figure 1. A) Parvovirus amplicons. The picture shows a 2.5X 192 agarose gel containing PCR
195 products
- 196 193 (275bp) from different samples. Lane 1: DNA length marker (gene ruler 100-1000 bp DNA
197 Ladder
- 198 194 plus, Fermentas); lane 2, 4 and 8 CPV- positive samples. Lane 6 and 10, CPV-negative
199 samples.
- 200 195 B) Rotavirus amplicons (379bp). Lane 1: DNA length marker (gene ruler 100-1000 bp DNA
201 196 Ladder plus, Fermentas); lanes 3, 6, 7 and 9, CRV-positive samples; lanes 2, 4, 5, 8 and 10,
202 CPV197
- 203 Negative samples.

204

205 Figure 2. A) The 250 nucleotides sequenced from the amplified fragments of canine rotavirus

206 199 samples; sequences obtained were compared with sequences reported in Genbank:

207 GU565078.1,

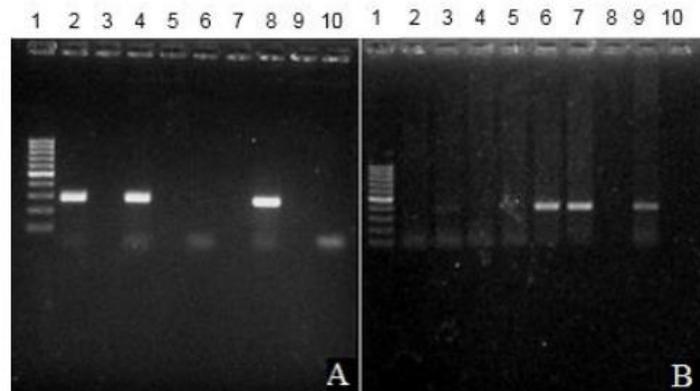
208 200 JX866792.1. EU708927.1 B) The 250 nucleotides sequenced from the amplified fragments of

209 201 canine parvovirus samples; sequences obtained were compared with reported sequences in

210 202 GenBank: KP694306.1, KP694305.1, and KP694304.1.

211

Figure 1



212

Figure 2

A

```

1      10      20      30      40      50      60      70
CCAGTGATTCTTAGACCCAAATAACGTTGAAGTAGAGTTTCTACTAAACGGGCAGATAATAAACTACTTACC
      80      90      100     110     120     130     140
AAGCAAGATTTGGAACGATCATAGCTAGAAAATTTGATACAATTAGATTGTCATTTAGTTGATGAGACC
      150     160     170     180     190     200     210
ACCAAAATATGACACCAGCGGTAGCGCGGTTATTTCCAAAIGCGCAGCCATTTGAACATCAIGCAACAGTA
      220     230     240     250
GGACTCACGCTTAGAATTGAAICTGCAGTTTGTGAATCAG
    
```

B

```

1      10      20      30      40      50      60      70
ACAACATGGTCAAAAACTACCACAACAGGAGAAACACCTGAGAGATTTACATATATAGCACATCAAGAT
      80      90      100     110     120     130     140
ACAGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAAATATTAACITTAACCTTCTGTACAGAAAGATAATG
      150     160     170     180     190     200     210
TATTGCTACCAACAGATCCACTTGSAGSTAAAACAGGAATTAAGTATACTAATATATTTAATACTTATGG
      220     230     240     250
TCCTTTAACTGCATTAAATAATGTACCACCAGTTTATCCA
    
```

213

214

Table I. Clinical signs and hematologic findings in dogs infected with canine parvovirus (CPV-2), dogs infected with canine rotavirus (CRV) and co-infected (Parvovirus-Rotavirus) dogs with gastroenteritis

^a Clinical signs, physical examination, and laboratory test results in dogs with enteritis	% of dogs with CPV infection	% of dogs with CRV infection	% of dogs with co-infection with ^c CPV-CRV
	(n=27)	(n=7)	(n=11)
Abdominal pain	66.6%	28.5%	81.8%
Anorexia	33.3%	0	72.7%
Lethargy	81.48 %	14.28%	100%
Vomiting	44.4 %	14.28%	54.5%
Fever (>39.5°C)	14.81%	0	36.3%
Hemorrhagic diarrhea	70.3.8%	14.2%	90.9%
Mucoid diarrhea	29.6%	85.71%	9.0%
^b Leukocytosis (<6.0 X 10 ³ /μL)	0	28.5%	18.1%
^b Leukopenia (<4.5 X 10 ³ /μL)	40.7%	0	54.5%
^b Panleukopenia (<200 X 10 ³ /μL)	14.81%	0	36.3%

^a Reference ranges in parentheses; ^b values in the table are 3 X10³/mL; CPV — Canine parvovirus; CRV — Canine rotavirus; co- infection with — CPV-CRV

215

14. Discusión general

Las asociaciones de parvovirus con otros rotavirus- coronavirus se encuentran presentes en la población canina del Estado de México, como lo confirman diversos autores en otras partes del mundo (Decaro, 2005), (Martella, 2011). Existen reportes de infecciones triples por parvovirus- rotavirus y coronavirus (Williams 1980), pero este estudio identifico como asociación más común parvovirus con rotavirus.

Los signos clínicos de rotavirus fueron menos severos que los de parvovirus; perros infectados con rotavirus exclusivamente, muestran dolor abdominal, letargo, vómito, diarrea mucoide y en algunos casos leucocitosis. Sin embargo, en los perros coinfectados observamos síntomas gastrointestinales graves, además de la leucopenia, la panleucopenia, diarrea mucoide o hemorrágico, vómitos y letargo. Estos síntomas eran incluso más grave que los observados en los perros infectados con sólo el parvovirus (Tabla 10). Esto es importante debido a que en este estudio si se observaron incrementados los cuadros clínicos cuando se presentaba parvovirus asociado a rotavirus, en comparación de cuadros con perros que solo tenían parvovirus.

Los datos del presente estudio se compararon con estudios previos y se observó en este trabajo, relativamente un alto porcentaje de perros con co-infección (14%) en relación con los hallazgos de otros países, por ejemplo 2,4% ha sido reportado en EE.UU., como infiere de hemaglutinación pasiva inversa (RPHA), en Japón, el 1,2% se estimó a partir de aislamiento viral y 2% utilizando microscopía

electrónica, mientras que en Italia no hubo identificaciones utilizando PÁGINA (Tupler, 2012, Mochizuki, 2001, Yesilbag, 2008). Consideramos porcentajes bajos podrían estar relacionados con las técnicas empleadas en estos estudios, en este sentido, en el presente estudio se utilizó RT-PCR, que ha demostrado una mayor sensibilidad (Kanter, 2015). También es posible que contrastantes resultados están influenciados por el país donde se realizaron los estudios, ya que está bien documentado que diferentes rotavirus están asociadas con bajos ingresos países / áreas. Por otra parte, otros estudios han reportado la presencia de rotavirus sólo en cachorros menores de dos meses de edad o recién nacidos (Martella, 2001), sin embargo, aquí se detectó la infección por rotavirus en los perros mayores de 6 meses de edad.

15. Conclusión

Nuestro informe es el primer estudio que demuestra la presencia de rotavirus circulantes en los perros del Estado de México. Aunque el rotavirus es de poca importancia para los veterinarios, ya que tiene una baja tasa de mortalidad, en el presente estudio se observó que desempeña un papel importante en la gravedad de la gastroenteritis viral, sobre todo cuando se asocia al parvovirus canino. Por otro lado, aunque el parvovirus es considerado el patógeno más importante en la gastroenteritis canino, el rotavirus es de especial interés para la salud pública debido a su potencial zoonótico. En apoyo de esto, existen informes de transmisión entre especies de rotavirus caninos de grupo G3 a niños en Italia y Taiwán (Almuerzos, 2012).

Aunque este es el primer reporte de rotavirus en caninos del Estado de México, deben realizarse futuros estudios de epidemiología molecular para identificar los genotipos circulantes en las poblaciones de perros en todo México, ya que esto aumentará nuestra comprensión sobre la importancia del rotavirus en los perros.

16. Referencias

- I. Gizzi AB, Oliveira ST, Leutenegger CM, Estrada M, Kozemjak DA, Stedile R, Marcondes M, Biondo AW. Presence of infectious agents and co-infections in diarrheic dogs determined with a real-time polymerase chain reaction-based panel. *BMC Vet Res.* 2014; 16:10:23
- II. Rimmelzwaan GF, Groen J, Egberink H, Borst GH, UytdeHaag FG, Osterhaus AD. The use of enzyme-linked immunosorbent assay systems for serology and antigen detection in parvovirus, coronavirus and rotavirus infections in dogs in the Netherlands. *Vet Microbiol.* 1991; 26(1-2):25-40
- III. Pérez R, Calleros L, Marandino A, Sarute N, Iraola G, Grecco S, Blanc H, Vignuzzi M, Isakov O, Shomron N, Carrau L, Hernández M, Francia L, Sosa K, Tomás G, Panzera Y. Phylogenetic and Genome-Wide Deep-Sequencing Analyses of Canine Parvovirus Reveal Co-Infection with Field Variants and Emergence of a Recent Recombinant Strain. *Plos one.* 2014; 9:11
- IV. Mochizuki M, Hashimoto M, Ishida T. Epidemiological status of canine viral enteric infections and giardia infection in Japan. *J Vet Med Sci.* 2001; 63(5):573-5
- V. Decaro N, Martella V, Elia G, Desario C, Campolo M, Lorusso E, Colaianni L, Lorusso E, Buonavoglia C. Tissue distribution of the

- antigenic variants of canine parvovirus type 2 in dogs. *Vet Microbiol.* 2008; 121:39-44.
- VI. Roldan c, Páez V, Charles Niño C, Elizondo D, López MA. Genotyping of Canine parvovirus in western Mexico. *J Vet Diagn Invest.* 2015; 27(1):107-11.
- VII. Prittie J, Canine parvoviral enteritis: a review of 162 diagnosis, management, and prevention. *J Vet Emerg Crit Care.* 2004; 14(3):167-176.
- VIII. Goddard A, A Leisewitz. (2010). Canine parvovirus. *Veterinary Clinician Small Animal practice* 40,1041-1053.
- IX. Meunier P, B Cooper, M Appel, M Lanieu, D Slauson. (1985). Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: sequential virus distribution and passive immunization studies. *Veterinary Pathology* 22, 617-624.
- X. Decaro N, Desario C, Addie D, Martella V, Vieira M, Elia G, Zicola A, Davis C, Thompson G, Thiry E, Truyen U, Buonavoglia C. (2007). Molecular Epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerging Infectious Disease* Vol. 13 8, August 2007.
- XI. Schoeman J, A Goddard, A Leisewitz. (2013). Biomarkers in canine parvovirus enteritis. *New Zealand Veterinary Journal* 6, 217-222.
- XII. Lamm C, Rezabek G. (2008). Parvovirus infection in domestic companion animals. *Veterinary Clinical Small Animal Practice* 38 837-850.

- XIII. Truyen U. (2006). Evolution of canine parvovirus-A need for new vaccines. *Veterinary Microbiology* 117 (2006) 9-13.
- XIV. Carmichael LE. 2005. An annotated historical account of canine parvovirus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 52, 303-311.
- XV. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek M, Studdert MJ. *Veterinary Virology*. 3rd ed. New York: Academic Press; 1999. p. 169–70.
- XVI. Hueffer K, Parrish C. (2003). Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Current Opinion in Microbiology* 2003, 6:392-398
- XVII. Hoelzer K, Parrish C. (2010). The emergence of parvoviruses of carnivores. *Veterinary. Research*. 41:39.
- XVIII. Tennant BJ, Gaskell RM, Jones RC. Studies on the epizootiology of canine coronavirus *The Veterinary Record* 1993; 132: 7-11. 5.
- XIX. Everman JF, McKeirman AJ, Eugster AK, et al. Update on canine coronavirus infections and interactions with other enteric pathogens of the dog. *Companion Animal Practice* 1989;19(2):6:12. 6.
- XX. Greene CE: Immunoprophylaxis and immunotherapy, in Greene, CE (ed): *Infectious Diseases of the Dog and Cat* WB Saunders Co., Philadelphia, pp 717-726, 1998.
- XXI. Pardo MC, Mackowiak M. Safety of a new modified live virus vaccine against canine coronavirus. *Canine Practice* 2000; 25(1): 16-19.
- XXII. Gómez, J; Sordo, ME; Gentile, A et al. Epidemiologic patterns of diarrheal disease in Argentina: estimation of Rotavirus disease burden.

- XXIII. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21(9):843-850. Tregnaghi M y col. Abstract 218. 4th WSPID, Varsovia 1-4 setiembre, 2005.
- XXIV. Castello A, Arvay M, Glass R y Gentsch J. Vigilancia de cepas de rotavirus en Latinoamérica. Revisión de los últimos nueve años. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23: S168-172.
- XXV. Velásquez F, Matson D, Calva J et al. Rotavirus Infection in Infants as protection against subsequent Infections. *N. Engl J Med* 1996; 335:1022-28
- XXVI. De Vos, B; Vesikari, T; Linhares, A y col. A Rotavirus Vaccine for Prophylaxis of Infants Against Rotavirus Gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23: S179-182.
- XXVII. Heaton P, Goveia M, Millar J y col. Development of a Pentavalent Rotavirus Vaccine against Prevalent Serotypes of Rotavirus Gastroenteritis. *JID* 2005; 192: S17-21.
- XXVIII. Murphy T, Gargiullo P, Massoudi M, et al. Intussusception among Infants Given an Oral Rotavirus Vaccine. *N Engl J Med* 2001; 344 564–72.
- XXIX. Saez-Llorens X, Guevara JN. Intussusception And Rotavirus Vaccines: What Is The Background Risk? *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23: 364-365.

Anexo 1



HOJA DE DIAGNÓSTICO CLÍNICO PROYECTO PANEL GASTROENTERICO: PARVOVIRUS CANINO, ROTAVIRUS CANINO, CORONAVIRUS CANINO.

Fecha:						
Nombre del paciente:			Expediente:			
Edad:			Raza:			
Sexo:						
Vacunación y fecha:						
Desparasitación:						
CONSTANTES FISIOLÓGICAS						
FC:			FR:			
TLLC:			Linfonodos:			
RT:			T°:			
SIGNOS CLÍNICOS						
Diarrea	Si	No	Sanguinolenta	Melena	Presencia de moco	Presencia de parásitos
Vómito	Si	No	Características:			

DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO	
Médico 1	
Médico 2	
Médico 3	

ESTUDIOS DE LABORATORIO	
Hemograma	Coproparasitoscópico

Especificaciones de las muestras para RT y PCR, bacteriológico
2 Hisopados rectales en vial de 1.5 ml y no diluir con nada, ambas muestras identificadas con el nombre del paciente y refrigerar a -20°C (congelador)
1 hisopado rectal en medio Stuart, identificadas con el nombre del paciente y refrigerar no congelar ni sobrecalentar.
1 Muestra de suero identificada con el nombre del paciente.