

16

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID

Facultad de Veterinaria
Departamento de Patología Animal I

CORONAVIRUS CANINO:
IDENTIFICACION EN ESPAÑA.
DESARROLLO DE TECNICAS
PARA EL DIAGNOSTICO E
INMUNIZACION

M^a DEL MAR MARTIN CALVO

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN
VETERINARIA

Madrid, 1993



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Dña. Isabel Simarro Fernández, profesora titular del Departamento de Patología Animal I de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada "Coronavirus canino: identificación en España. Desarrollo de técnicas para el diagnóstico e inmunización", de la que es autora la licenciada en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid Dña. M^a del Mar Martín Calvo, ha sido realizada en las dependencias del Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, en colaboración con el Departamento de Sanidad Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA), bajo mi dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de doctor en Veterinaria.

De acuerdo con la normativa vigente, firmo el presente certificado, autorizando su presentación -como directora de la mencionada tesis doctoral-, en Madrid, a cinco de marzo de mil novecientos noventa y tres.

Prof. Dra. Isabel Simarro Fernández

INDICE

pg.

I. INTRODUCCION

I.1. INTRODUCCION	
I.1.1. Complejo entérico canino	3
I.2. PERSPECTIVA HISTORICA	5
I.3. FAMILIA CORONAVIRIDAE. CORONAVIRUS CANINO	
I.3.1. Características generales de la familia	7
I.3.2. Cultivo del CVC	10
I.3.3. Propiedades fisico-químicas	11
I.3.4. Genoma	11
I.3.5. Proteínas estructurales	12
I.3.6. Multiplicación del CVC	15
I.3.7. Relaciones antigénicas del CVC	17
I.4. EPIZOOTIOLOGIA	19
I.5. PATOGENIA	21
I.6. SINTOMAS Y LESIONES	24
I.7. DIAGNOSTICO	
I.7.1. Antecedentes epizootiológicos	26
I.7.2. Diagnóstico laboratorial	27
I.7.2.1. Detección del antígeno vírico	28
- Microscopía electrónica	28
- Aislamiento en cultivo celular	29
- Inmunofluorescencia directa (IFD) .	30
- ELISA.....	31

	II
I.7.2.2. Detección de anticuerpos	31
- Seroneutralización	32
- Inmunofluorescencia indirecta	32
- ELISA indirecto	33
I.8. TRATAMIENTO	33
I.9. RESPUESTA INMUNITARIA. PROFILAXIS	34
I.9.1. Profilaxis sanitaria	36
I.9.2. Profilaxis médica	37
II. JUSTIFICACION Y FINES	40
III. MATERIAL Y METODOS	
III.1. REACTIVOS Y SOLUCIONES	
III.1.1. Reactivos	43
III.1.2. Soluciones	45
III.2. MATERIAL FOTOGRAFICO	50
III.3. RECOLECCION Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	
III.3.1. Antecedentes clínicos	50
III.3.2. Heces	50
III.3.3. Sueros	51
III.4. CEPAS DE VIRUS	52
III.5. CULTIVOS CELULARES	
III.5.1. Líneas celulares empleadas	52
III.5.2. Mantenimiento de las líneas celulares ..	53
III.5.3. Conservación de las líneas celulares ...	53

III.6. SUEROS DE REFERENCIA	54
III.7. METODOS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA	
III.7.1. Tinción negativa. Inmunomicroscopía electrónica (IME)	54
III.7.2. Cortes ultramicroscópicos	55
III.8. PRODUCCION DE VIRUS EN CULTIVOS CELULARES	
III.8.1. Aislamiento de virus	56
III.8.2. Cálculo de la multiplicidad de infección (m.i.)	56
III.8.3. Obtención de inóculos víricos	57
III.8.4. Titulación de los inóculos (DI ₅₀ CT)	57
III.8.5. Purificación del virus	58
III.8.6. Titulación del virus purificado (ELISA)	58
III.9. PROTEINAS VIRICAS: OBTENCION, VALORACION Y ANALISIS	
III.9.1. Solubilización de proteínas con Tritón X-114	59
III.9.2. Valoración de proteínas	59
III.9.3. Análisis de proteínas	60
III.9.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	60
III.9.3.2. Análisis densitométrico	61
III.9.3.3. Análisis mediante inmuno- detección de proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa ..	61
III.10. METODOS SEROLOGICOS	
III.10.1. Seroneutralización	62

III.10.2. Técnicas inmunoenzimáticas (ELISA indirecto)	63
III.10.2.1. ELISA comercial	63
III.10.2.2. ELISA experimental	63
III.10.3. Inmunodetección de proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa (ID)	64
III.11. EXPERIMENTACION ANIMAL	
III.11.1. Animales empleados	65
III.11.2. Preparación de los productos ensayados. Adyuvantes	65
III.11.2.1. Coronavirus canino (cepa P-Madrid/90)	65
III.11.2.2. Proteínas víricas	66
III.11.2.3. Vacuna comercial	66
III.11.3. Protocolo experimental	66
III.11.4. Contraprueba	68
III.12. METODOS ESTADISTICOS	
III.12.1. Evaluación de las técnicas de diagnóstico. Sensibilidad y especificidad	69
III.12.2. Grado de acuerdo entre las técnicas empleadas	70

IV. RESULTADOS

IV.1. RESULTADOS DEL AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DEL CORONAVIRUS CANINO	
IV.1.1. Aislamiento en cultivos celulares	73
IV.1.2. Microscopía electrónica	73
IV.1.2.1. Tinción negativa	73
IV.1.2.2. Cortes ultramicroscópicos	75

IV.1.3.	Adaptación del virus aislado (cepa P-Madrid/90) a la línea celular. Títulos obtenidos	75
IV.1.4.	Obtención de inóculos. Títulos alcanzados..	76
IV.1.5.	Purificación de virus. Títulos obtenidos ..	77
IV.1.6.	Estudio de las proteínas víricas estructurales mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	78
IV.1.7.	Identificación de la cepa de campo mediante inmunodetección de proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa	78
IV.2.	RESULTADOS DE LOS METODOS SEROLOGICOS	
IV.2.1.	Puesta punto de las técnicas	79
IV.2.1.1.	Puesta a punto del ELISA experimental	79
IV.2.1.2.	Puesta a punto de la técnica de inmunodetección de proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa (ID)	82
IV.2.2.	Resultados obtenidos a partir de los sueros experimentales	82
IV.2.2.1.	Seroneutralización	83
IV.2.2.2.	ELISA experimental	83
IV.2.2.3.	Sensibilidad y especificidad	83
IV.2.3.	Resultados obtenidos a partir de los sueros de campo	86
IV.2.3.1.	Comparación de las dos técnicas ELISA	86
IV.2.3.2.	ELISA experimental	88
IV.2.3.3.	ELISA comercial	88
IV.2.3.4.	Concordancia entre pruebas: ELISA experimental y comercial	88

IV.2.3.5. Inmunodetección de proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa (ID)	92
IV.2.3.6. Comparación de resultados sobre una muestra de sueros discrepantes	92
IV.3. RESULTADOS DE LA EXPERIMENTACION ANIMAL	
IV.3.1. Análisis y preparación de los productos ensayados	94
IV.3.1.1. Análisis de las proteínas víricas estructurales mediante SDS-PAGE, tras la solubilización con Tritón X-114	94
IV.3.1.2. Resultados de la densitometría: pureza, proporciones relativas y rendimiento de obtención de las proteínas estructurales	94
IV.3.1.3. Virus completo: inactivación con beta-propiolactona (BPL)	100
IV.3.2. Respuesta serológica	100
IV.3.2.1. Resultados obtenidos mediante seroneutralización frente a los productos inoculados	100
IV.3.2.2. Resultados obtenidos mediante ELISA frente a los productos inoculados	102
IV.3.2.3. Resultados obtenidos mediante inmunodetección de proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa frente a los productos inoculados	106

	VII
IV.3.3. Resultados clínicos	107
IV.3.3.1. Sintomatología clínica	107
IV.3.3.2. Análisis hemático	107
IV.3.3.3. Análisis coprológico	108
IV.3.4. Aislamiento del virus en heces después de la contraprueba	109
V. DISCUSION	112
VI. CONCLUSIONES	139
VII. BIBLIOGRAFIA	142
VIII. ICONOGRAFIA	171

I. INTRODUCCION

ABREVIATURAS

ARN - Acido ribonucleico
CVB - Coronavirus bovino
BPL - Betapropiolactona
CVC - Coronavirus canino
CVEF - Coronavirus entérico felino
DI₅₀CT - Dosis infectante 50 en cultivo de tejidos
D.O. - Densidad óptica
dpi - Dias post-infección o post-inoculación
ECP - Efecto citopático
ELISA - Enzimoimmunoensayo
CVH - Coronavirus humano
VEH - Virus de la encefalomiелitis hemaglutinante del cerdo
hpi - Horas post-infección
Ig - Inmunoglobulina
IME - Inmunomicroscopía electrónica
ID - Inmunodetección de proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa
kD - Kilodalton
ME - Microscopía electrónica
MHV - Virus de la hepatitis murina
m.i.- Multiplicidad de infección
PBS - Solución salina tamponada con fosfatos
Pm - Peso molecular
PTA - Acido fosfotúngstico
PVC - Parvovirus canino
RER - Retículo endoplásmico rugoso
SDS - Dodecil sulfato sódico
SFB - Suero fetal bovino
SPF - Libre de patógenos específicos
SN - Seroneutralización
VGPT - Virus de la gastroenteritis porcina transmisible
VPIF - Virus de la peritonitis infecciosa felina

I. INTRODUCCION

I.1. INTRODUCCION

Las diarreas neonatales en la especie canina, de modo semejante a lo que sucede en otras especies, constituyen un síndrome de etiología diversa derivada de la interacción entre el hospedador, el entorno y los agentes infecciosos implicados. En el desencadenamiento del proceso clínico hay que considerar varios factores. Entre ellos, los más importantes relacionados con el **hospedador** son: la receptividad individual, la edad y el nivel de anticuerpos de la madre, la eficacia del aporte inmunitario materno en cuanto a la cantidad, momento de la ingestión, composición y absorción del calostro ingerido por el cachorro, etc.

Por otro lado, en el concepto de **entorno** se encuentran comprendidos los factores ambientales y de manejo, como son los derivados del alojamiento, del número y concentración de animales, de las medidas higiénicas, de la alimentación, etc.

En relación con los **agentes patógenos**, hay que mencionar en primer lugar que las infecciones mixtas en las que intervienen varios agentes enteropatógenos son de presentación más frecuente y de carácter más grave que las producidas por uno solo. Aquellos microorganismos implicados en las infecciones mixtas pueden intervenir simultáneamente, o bien sucederse de forma escalonada.

I.1.1. Complejo entérico canino

La aparición de problemas graves de diarrea en la especie canina suele ir asociada al concurso de diversos agentes víricos, bacterianos y parasitarios (Appel, 1988; Edsall, 1989). Este tipo de interacción se conoce como "complejo entérico canino". Los virus aislados con una mayor frecuencia a partir de los animales

afectados son parvovirus, coronavirus y rotavirus. Otros virus participarían en menor medida en la etiología de este síndrome, como son calicivirus, adenovirus y virus del moquillo. Las bacterias y parásitos más destacados se encuentran incluidos en los géneros **Campylobacter**, **Escherichia**, **Salmonella** y **Giardia** (England y Poston, 1980; Evermann y col., 1980; Binn y col., 1981; Marshall y col., 1984; Appel, 1988; Edsall, 1989; Evermann y col., 1989).

De los agentes víricos implicados en este complejo, el coronavirus canino (CVC) probablemente ocupa el segundo lugar en importancia después del parvovirus canino (PVC).

La infección por el CVC ocasiona cuadros de gastroenteritis en los perros, pudiendo verse afectados animales de cualquier edad. En los jóvenes, los signos clínicos son más graves y su aparición más frecuente.

La mayor incidencia de la enfermedad se detecta en poblaciones caninas cerradas, como pueden ser los criaderos, en los que suelen verse afectadas gran parte de las camadas (Helfer-Baker y col., 1980; Evermann y col., 1989).

Aunque la mortalidad no es muy alta generalmente, la aparición de procesos diarreicos con elevada morbilidad en este tipo de establecimientos, ocasiona importantes pérdidas económicas. Estas pérdidas derivan principalmente del retraso en el crecimiento y del incremento de la sensibilidad frente a otras infecciones en los cachorros afectados, así como de la necesidad de atención veterinaria, aplicación de terapia medicamentosa, etc.

La presencia de infecciones causadas por el CVC ha sido descrita con anterioridad en numerosos países, mientras que en el nuestro se ha puesto de manifiesto más recientemente (en 1992)

(Binn y col., 1974; Appel y col., 1979a; McNulty y col., 1980; Toma y Moraillon, 1980; Osterhaus y col., 1980; Tingpalapong y col., 1981; Yasoshima y col., 1983; Martín Calvo y col., 1992).

I.2. PERSPECTIVA HISTORICA

La confirmación del carácter patógeno del CVC, fue precedida por la descripción de una serie de evidencias serológicas de infección por el virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT) en perros. Este último agente se encuentra estrechamente relacionado, desde el punto de vista antigénico, con el CVC (Norman y col., 1970; Cartwright y Lucas, 1972; Garwes y Reynolds, 1981).

En estos casos de evidencias serológicas, la mayor parte de los perros estudiados no había mantenido contacto previo con miembros de la especie porcina. Debido a ello, se sugirió la existencia de un virus canino emparentado antigénicamente con el de la gastroenteritis transmisible.

La probabilidad de que la presencia de estos anticuerpos fuera consecuencia de la exposición de los perros al coronavirus porcino no podía excluirse, ya que Haelterman demostró en 1962 que perros y zorros podían ser infectados experimentalmente con el VGPT. Este autor logró aislar el virus en las heces y detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes, en ausencia de sintomatología clínica. Con base en estos datos, se consideró a los cánidos como potenciales portadores del VGPT (McClurkin y col., 1970; Norman y col., 1970).

La naturaleza del CVC como un virus específico de especie se confirmó en 1971. Binn y col., en 1974, describen el primer aislamiento de un coronavirus desconocido, durante un brote epizootico de gastroenteritis entre los perros de un cuartel

militar, en Alemania. El virus aislado, capaz de ser neutralizado por suero específico anti-VGPT, se designó como cepa 1-71 y fue incluido dentro de la recientemente establecida familia Coronaviridae.

Las investigaciones acerca de este tema comenzaron a hacerse más exhaustivas hacia febrero de 1978. A partir de esta fecha, surgieron una serie de brotes epizooticos de gastroenteritis canina en diversos estados del este y sureste de EEUU (Carmichael, 1978). Estos episodios tuvieron características comunes como la aparición brusca, una difusión rápida entre todos los efectivos, una morbilidad elevada y una mortalidad variable.

Un gran número de muestras patológicas procedentes de estos brotes se enviaron a la Universidad de Cornell de Nueva York. Allí se obtuvieron distintas cepas de CVC que resultaron serológicamente semejantes a los virus aislados previamente en Alemania (Appel y col., 1979a).

En el mes de agosto fue descrita una segunda serie de brotes de diarrea canina en los estados del medio oeste americano. A lo largo de este mismo año y en distintas zonas del mundo geográficamente muy distantes entre sí, se observó la aparición de brotes de gastroenteritis canina con características muy semejantes a los descritos en EEUU (Thompson y Gagnon, 1978; Appel y col., 1979b; Johnson y Spradbrow, 1979). En estas ocasiones, las tasas de morbilidad y mortalidad fueron muy elevadas, especialmente entre los cachorros menores de cinco meses de edad. También se dieron casos de muertes en animales adultos. Aunque en un principio se sospechó que el CVC podría ser el único agente etiológico, mediante microscopía electrónica pudo constatarse la presencia de partículas con características morfológicas correspondientes a parvovirus. En algunos casos se detectó la existencia de infecciones mixtas por ambos agentes (Appel y col., 1979).

A pesar de la coexistencia de infección en muchos de los brotes epizooticos, el responsable del impacto patológico en la población canina mundial fue el CVC. Este virus surgió como un nuevo agente etiológico y, por tanto, sus consecuencias fueron explosivas en una población inmunológicamente virgen. A diferencia de lo sucedido con el PVC, y al haberse encontrado evidencias serológicas de infección por CVC en numerosos países, es probable que la población hubiera tenido un cierto nivel inmunitario protector previo. Todo ello ha conferido al CVC un carácter de agente secundario en la etiología del "complejo entérico canino".

Se han descrito numerosas evidencias serológicas de infección por el CVC, acompañadas o no de aislamiento del agente, en EEUU (Appel y col., 1979a; Binn y col., 1979; Evermann y col., 1980; Turner, 1989), Canadá (Norman y col., 1970), Alemania (Binn y col., 1974; Herbst y col., 1988), Gran Bretaña (Cartwright y Lucas, 1972; McNulty y col., 1980), Bélgica (Pensaert y Callebaut, 1978; Vandenberghe y col., 1980), Francia (Roseto y col., 1980; Thery, 1980; Toma y Morailon, 1980), Holanda (Osterhaus y col., 1980; Rimmelzwaan y col., 1991), Tailandia (Tingpalapong y col., 1981), Japón (Yasoshima y col., 1983), Australia (Schnagl y Holmes, 1978) y más recientemente en España (Martín Calvo y col., 1992).

I.3. FAMILIA CORONAVIRIDAE. CORONAVIRUS CANINO

I.3.1. Características generales de la familia

El CVC está integrado en el único género de la familia Coronaviridae (Tyrrell y col., 1968; Tyrrell y col., 1975). Los distintos virus que componen esta familia producen infecciones en la especie humana y la mayor parte de los animales domésticos, entre los que se incluyen bóvidos, suidos, félidos, équidos y

aves (Holmes, 1979; Pensaert y Callebaut, 1978). Uno de los rasgos más relevantes de los coronavirus es su marcada especificidad de especie (McIntosh, 1974; Kapikian, 1977; Carmichael, 1978). La multiplicación de estos virus frecuentemente se limita a los macrófagos y a las células epiteliales de los aparatos respiratorio y digestivo.

La morfología de las partículas víricas visualizadas mediante microscopía electrónica es redondeada, aunque puede existir cierto grado de pleomorfismo. Su diámetro oscila entre 60 y 180 nm. En la superficie del virión, normalmente se visualizan una serie de proyecciones que configuran la "corona" característica de los miembros de esta familia. Estas proyecciones o peplómeros presentan forma de maza, su longitud aproximada es de 20 nm y no suelen estar presentes en las partículas intracelulares (Almeida y Tyrrell, 1967; Tyrrell y col., 1968).

En 1978, estos virus se clasificaron en dos grupos antigénicamente distintos (Pedersen y col., 1978).

Posteriormente, en 1983 se amplió la división a cuatro grupos antigénicos (Siddell y col., 1983). En la actualidad se considera además un quinto grupo en el que se incluyen virus de clasificación incierta. Las características más importantes de los distintos miembros de esta familia se detallan en la tabla 1.

TABLA 1.- Coronavirus: nombres, hospedadores naturales y síntomas causados (Tomado de Holmes, K.V. (1990), cap. 29, Virology, 2ª Edición, Fields, B.N.).

GRUPO ANTIGENICO	VIRUS ^a	HOSPEDADOR	SINTOMAS RESPIRATORIOS	SINTOMAS ENTERICOS	SINTOMAS HEPATICOS	SINTOMAS NEUROLOG.	OTROS ^b
I	CVH-229E	HUMANO	*				
	VGPT	PORCINO	*	*			*
	CVC	CANINO		*			
	CVEF	FELINO		*			
	VPIF	FELINO	*	*	*	*	*
II	CVH-OC43	HUMANO	*				
	VHM	MURINO	*	*	*	*	
	VEH	PORCINO	*	*		*	
	CVB	BOVINO		*			
	CVco	CONEJO		*			*
III	VBIA	AVIAR	*				*
IV	CVP	PAVO	*	*			
No clasif.	CVEH	HUMANO		*?			

^a Abreviaturas: CVH-229E, coronavirus respiratorio humano; VGPT, virus de la gastroenteritis porcina transmisible; CVC, coronavirus canino; CVEF, coronavirus entérico felino; VPIF, virus de la peritonitis infecciosa felina; CVH, coronavirus respiratorio humano; VHM, virus de la hepatitis murina; VEH, virus de la encefalomiелitis porcina hemaglutinante; CVB, coronavirus bovino; CVco, coronavirus del conejo; VBIA, virus de la bronquitis infecciosa aviar; CVP, coronavirus del pavo; CVEH, coronavirus entérico humano.

^b Otros síntomas causados por coronavirus incluyen peritonitis infecciosa, nefritis, pancreatitis, debilidad neonatal y adenitis.

En los últimos años ha sido incluido dentro del grupo I el coronavirus respiratorio porcino (CVRP) (Pensaert y col., 1986; Callebaut y col., 1988).

Según algunos autores, la inclusión del CVH-229E en el grupo I debiera ser reconsiderada (Sánchez y col., 1990).

I.3.2. Cultivo del CVC

El CVC no infecta cultivos celulares de origen porcino, bovino ni de primates, característica que confirma su estrecha especificidad de hospedador (Binn y col., 1974).

Este virus es capaz de replicarse en cultivos primarios de fibroblastos peritoneales, timo y riñón caninos, aunque se ha observado en ellos un comportamiento irregular en cuanto a la multiplicación del virus (Binn y col., 1974; Binn y col., 1980).

Algunas de las líneas celulares más utilizadas para la propagación del CVC han sido: MDCK, de riñón canino (Gauth y col., 1969), Cf₂Th, de timo canino (Nelson-Reer y col., 1976), CRFK, de riñón felino (Crandell y col., 1973; Kojima y col., 1986; Tuchiya y col., 1987), y FC, de feto felino (Woods, 1982).

Sin embargo, la línea celular que ofrece mayores ventajas para la producción a gran escala de este virus es la A-72, de origen tumoral canino. No se han observado irregularidades en la replicación del virus en esta línea, sobre todo en células de alto pase (Binn y col., 1980).

El efecto citopático producido por el CVC en la línea A-72 se caracteriza por la aparición de células aumentadas de tamaño, con formas extrañas y con material basófilo en su interior en algunas ocasiones. A veces, puede apreciarse la existencia de sincitios (Binn y col., 1974).

La adición de tripsina al medio de cultivo parece aumentar la infectividad de algunos coronavirus, aunque tal efecto no se ha demostrado para el CVC (Storz y col., 1981; Tuchiya y col., 1987; Dea y col., 1989).

I.3.3. Propiedades físico-químicas

La presencia de envoltura lipídica en el CVC determina una menor resistencia desde el punto de vista físico-químico que la de otros virus entéricos como parvovirus o rotavirus (Binn y col., 1974). Esta envoltura procede originalmente de las membranas intracitoplásmicas de la célula hospedadora.

Algunas de las normas establecidas para la caracterización físico-química de virus, incluyen las pruebas de sensibilidad a los tratamientos con solventes orgánicos, a pH ácido y con inhibidores de la replicación del ADN (Siddell y col., 1983). La infectividad del CVC disminuye notablemente mediante el tratamiento con éter o cloroformo. Su multiplicación no se ve inhibida por la acción de la 5-iododeoxiuridina, lo que denota que su ácido nucleico es ARN. Por último, no se inactiva a pH 3 cuando se somete a este tratamiento durante tres horas a 4°C. Por ello, puede considerarse como un virus ácido-estable. Esta característica, común a la mayoría de los coronavirus entéricos, le permite el paso a través del medio gástrico con mínimas pérdidas en infectividad (Binn y col., 1974; Holmes y col., 1980).

Es termolábil (sensible a 56°C durante 15 minutos), pero relativamente resistente a bajas temperaturas. Puede conservarse largos periodos de tiempo congelado a -70°C o liofilizado a 4°C (Pensaert y Callebaut, 1978).

I.3.4. Genoma

El genoma de los coronavirus está constituido por ARN monocatenario de polaridad positiva. Este genoma es el mayor de todos los virus ARN, con 27 a 30 kilopares de bases y presenta recombinación con una gran frecuencia (Bournsnell y col., 1987; Spaan y col., 1988).

El material genético se encuentra organizado en 6 ó 7 regiones, cada una de las cuales tiene una o más fases de lectura abierta ("Open Reading Frames", ORF). Estas se encuentran separadas por secuencias de unión que contienen la señal para la transcripción de varios ARN mensajeros subgenómicos. Se cree que estos ORF codifican polipéptidos no estructurales, cuya función biológica no está clara. Wesley y col. (1990) han indicado que, en el caso del VGPT, no son indispensables para la replicación del virus, pero podrían estar relacionadas con la virulencia, tropismo por un determinado tipo de células o la producción de infecciones persistentes en leucocitos de cerdo.

I.3.5. Proteínas estructurales

En general, los miembros de la familia Coronaviridae poseen tres proteínas estructurales mayoritarias (Garwes y Pocock, 1975; Callebaut y Pensaert, 1980; Garwes, 1980; Carmichael y Binn, 1981). En la denominación de estas proteínas hemos seguido la nomenclatura recomendada por el grupo de estudio de coronavirus, perteneciente al Comité Internacional de Taxonomía de Virus (Cavanagh y col., 1990).

De las tres proteínas estructurales, dos son glicoproteínas con peso molecular menor de 50 kD y mayor de 60 kD, respectivamente. Se sitúan en la bicapa lipídica del virus formando la envoltura. La primera de ellas se conoce como proteína de la matriz (**M**, anteriormente E1) y es una de las pocas glicoproteínas víricas con enlaces O-glicosídicos (Holmes y col.,

1981; Niemann y Klenk, 1981). Esta proteína es necesaria para la maduración del virus y su acumulación en las membranas del aparato de Golgi determina el lugar de ensamblaje de las nucleocápsidas (Holmes y col., 1981; Tooze y col., 1984; Tooze y Tooze, 1985). Los anticuerpos inducidos por esta glicoproteína pueden neutralizar la infectividad vírica, pero únicamente en presencia de complemento, como se ha demostrado para el VHM y el VGPT (Collins y col., 1982; Woods y col., 1988).

La segunda es la proteína de los peplómeros (**S**, anteriormente E2), que configura la corona de proyecciones característica de la familia (Almeida y col., 1968; Tyrrell y col., 1968). Esta proteína es responsable de la adherencia del virión al receptor de la célula hospedadora y de la inducción de anticuerpos neutralizantes (Garwes y col., 1978/79; McNaughton, 1982; Sturman y Holmes, 1983; Boyle y col., 1987; Garwes y col., 1988). Asimismo, posee actividad de fusión de membranas y en algunos casos su escisión es esencial para el inicio de la actividad infectiva del virión (Holmes y col., 1981; Storz y col., 1981; Collins y col., 1982; Fleming y col., 1983; Talbot y col., 1984; Sturman y col., 1985; Frana y col., 1985). La presencia de esta glicoproteína en la superficie de las células infectadas, puede inducir fenómenos de citotoxicidad mediada por células (Holmes y col., 1986).

Se ha estudiado la estructura antigénica de la glicoproteína S del VGPT y han sido definidos en ella cuatro sitios antigénicos, denominados A, B, C, y D. El primero es el fundamental en cuanto a neutralización, y posee tres subsitios denominados Aa, Ab, y Ac (Jiménez y col., 1986; Correa y col., 1988; Delmas y col., 1986).

La tercera proteína mayoritaria, de peso molecular entre 50 y 60 kD, no está glicosilada y se denomina proteína de la nucleocápsida (**N**), ya que se encuentra asociada al ARN vírico.

Algunos coronavirus pertenecientes a los grupos II y IV (CVH-OC43, VEH, CVB y CVP) poseen otra proteína estructural, conocida como **HE** (ó E3), de 120 a 140 kD (Callebaut y Pensaert, 1980; Hogue y Brian, 1986; Deregt y col., 1987; Callebaut y col., 1988). Esta proteína tiene actividad hemaglutinante, hemadsorbente y acetilesterasa (Vlasak y col., 1988).

Las tres proteínas estructurales mayoritarias del CVC que se corresponden con las descritas para otros miembros de la familia son: la glicoproteína peplomérica (**S**, de 204 kD), la de la nucleocápsida (**N**, de 50 kD) y la glicoproteína de la matriz (**M**, de 32 kD). Algunos autores describen una cuarta proteína estructural mayoritaria de 22 kD, cuya ubicación está sujeta a controversia (Garwes y Reynolds, 1981).

Se ha descrito la existencia de dos proteínas no estructurales en células infectadas con el CVC, de 12 y 14 kD, respectivamente (Laviada y col., 1991).

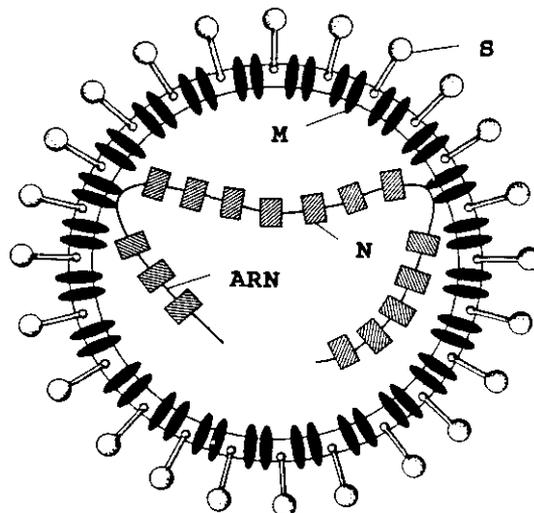


Fig. 1.- Esquema de la estructura de un coronavirus. Se muestran: genoma (**ARN**), proteína de la nucleocápsida (**N**), glicoproteína de la matriz (**M**) y glicoproteína peplomérica (**S**) (tomado de Sturman y Holmes, 1983).

I.3.6. Multiplicación del CVC

El CVC se multiplica en el ápice de la vellosidad intestinal. Dentro del intestino delgado, la zona más afectada suele corresponder al ileon. La colonización de los enterocitos puede alcanzar una gran extensión, incluso los dos tercios apicales de la vellosidad (Takeuchi y col., 1976).

Todo el ciclo de replicación tiene lugar en el citoplasma de la célula infectada (Holmes, 1985).

En una primera fase, el virus se une a los receptores de membrana de los enterocitos a través de sus peplómeros. Probablemente, la penetración se realiza a nivel de la base de las microvellosidades mediante un proceso de pinocitosis, seguido de la fusión de la envuelta vírica con la membrana celular.

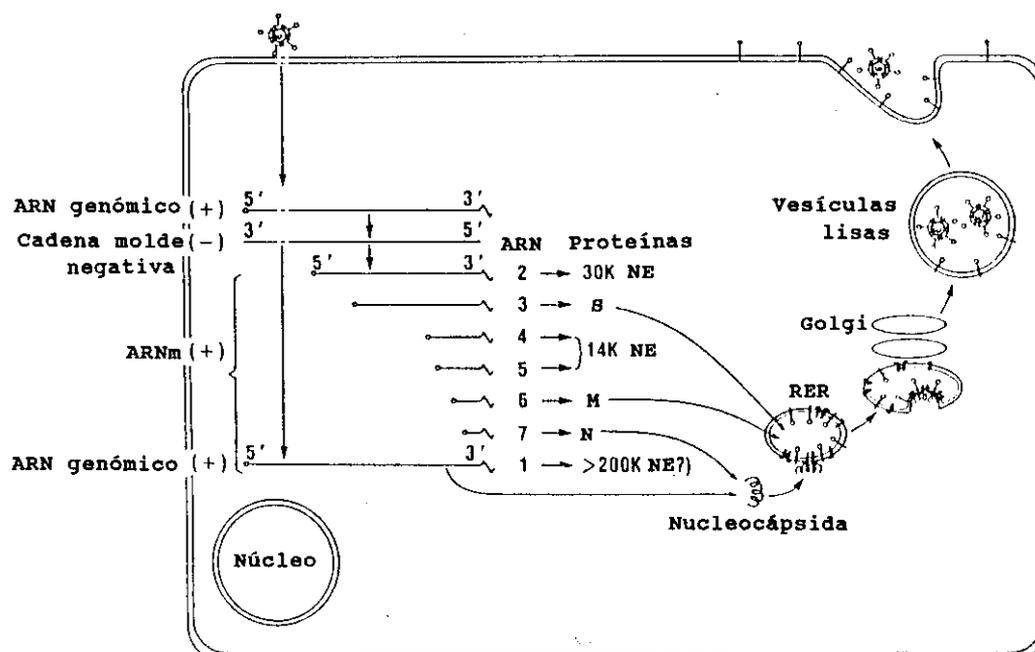


Fig. 2.- Esquema de la multiplicación de los coronavirus basado en el modelo murino (VHM) (tomado de Sturman y Holmes, 1983).

Inmediatamente después del ingreso del virus en la célula hospedadora y a partir de su ácido nucleico, se sintetiza una ARN polimerasa ARN dependiente, que da lugar a la formación de una cadena genómica completa de polaridad negativa. Esta cadena servirá de molde para la síntesis de nuevas copias de ácido nucleico y de los ARN mensajeros (ARNm) (Lai y col., 1982). Así, se origina un conjunto de ARNm de tamaños decrecientes con el extremo 3' en común, de los que sólo se traduce la secuencia no común con el ARN inmediatamente inferior.

Al menos se sintetizan 8 ARNm en la célula infectada, como comunican Wesley y col., (1989) para el VGPT. Otros autores, sin embargo, describen un número variable entre 5 y 9 (Dennis y Brian, 1982; Hu y col., 1984; Jacobs y col., 1986).

Además de los genes que codifican para las tres proteínas estructurales (S, N y M), se han identificado otras regiones que codificarían para la síntesis de otras proteínas no estructurales (NE).

La proteína N se traduce en los polisomas libres y se une al ARN genómico en el citoplasma para formar nucleocápsidas helicoidales.

Las glicoproteínas M y S se sintetizan en los ribosomas de membrana. El exceso de ésta última que no se incorpora a los viriones es transportado a la membrana plasmática.

Según estudios realizados con el virus de la hepatitis murina (VHM), el ensamblaje del virión en el interior de la célula infectada se lleva a cabo en las membranas del retículo endoplásmico rugoso (RER) y del aparato de Golgi, lugares en los que se acumula la proteína M (Tooze y col., 1984).

Los virus cuya envoltura deriva de estas membranas intracelulares, como es el caso de los coronavirus, parecen ser más resistentes a la solubilización con detergentes que aquellos otros cuya envoltura procede de la membrana plasmática (Sturman y Holmes, 1983).

Una vez finalizado el ensamblaje, los viriones son liberados mediante gemación a la luz de las vesículas derivadas del RER y aparato de Golgi, donde se almacenan (Becker y col., 1967; Oshiro, 1973; Massalski y col., 1982; Tooze y Tooze, 1985). Así, puede observarse la presencia de viriones maduros dentro de la célula, incluso antes de que la proteína S migre a la membrana celular y llegue a inducir una reacción citotóxica.

Por último, las partículas víricas son liberadas al exterior mediante lisis celular o por fusión de las vesículas de almacenaje con la membrana plasmática (Takeuchi, 1976; Sturman y Holmes, 1983; Holmes y col., 1984).

La posibilidad de liberación de virus completo sin daño celular (mediante un proceso de exocitosis o como un mecanismo de secreción) una vez finalizado el ciclo de replicación, podría ser un factor fundamental para el desarrollo de infecciones subclínicas.

I.3.7. Relaciones antigénicas del CVC

El CVC está emparentado antigénicamente con el VGPT y, de forma más estrecha, con el VPIF (Evermann y col., 1981; Horzinek y col., 1982; Stoddart y col., 1988; Laviada y col., 1991; Hohdatsu y col., 1991). Las proteínas estructurales mayoritarias de los tres virus son tan semejantes que algunos autores consideran a estos agentes como "mutantes" de hospedador. Algunos autores comunican que la presencia de una glicoproteína mayoritaria de 22 kD en el CVC y su ausencia en el VGPT supone

la diferencia más destacable en la composición proteica de ambos virus (Garwes y Reynolds, 1981).

Durante el curso de diversas infecciones experimentales con el VGPT en perros, pudo observarse que los animales no desarrollaron lesiones macro ni microscópicas del epitelio intestinal, ni síntomas clínicos de gastroenteritis (Haelterman, 1962; Larson y col., 1979). Sin embargo, mediante microscopía electrónica se detectó la presencia de partículas víricas en el epitelio yeyunal, y pudo comprobarse la eliminación del virus en heces durante un período superior a dos semanas. Estos resultados proporcionaron en aquel momento una base para la hipótesis acerca del posible papel del perro en la epizootiología del VGPT, conjetura poco considerada en la actualidad.

Por otra parte, el CVC es capaz de producir lesiones en el epitelio intestinal de lechones infectados experimentalmente (sobre todo en íleon), aunque no da lugar a la aparición de síntomas clínicos (Woods y col., 1981).

Se han realizado distintas pruebas de seroneutralización recíproca entre el CVC y otros coronavirus del mismo grupo antigénico. En el caso de los ensayos realizados con el CVC y el VGPT, los títulos de los sueros producidos frente a cada uno de ellos resultaron mayores en las pruebas de neutralización homólogas que en las heterólogas (Woods y Wesley, 1986). En cambio, un suero felino anti-VPIF neutraliza el CVC más eficazmente que el suero anti-VGPT. Probablemente, ello es indicativo de la mayor proximidad antigénica del coronavirus canino con el felino que con el porcino (Reynolds y col., 1980). Esta hipótesis parece confirmarse mediante algunos estudios de homología antigénica realizados con anticuerpos monoclonales (Sánchez y col., 1990).

I.4. EPIZOOTIOLOGIA

La gastroenteritis producida por el CVC es una enfermedad infecciosa de difusión rápida. De forma semejante a lo que sucede con otros virus entéricos, su transmisión es fecal-oral y la fuente primaria de contagio está constituida por las heces de los animales afectados. La infección se disemina a través de la contaminación de objetos y del medio ambiente. Se ha demostrado que, en condiciones favorables, el virus puede permanecer viable en las heces durante un período aproximado de 10 días .

La incidencia de la enfermedad se centra en los cachorros de 1'5 a 3 meses de edad, aunque también los perros adultos pueden ser receptivos a la infección. La tasa de morbilidad es variable, pero la de mortalidad es normalmente baja.

Los animales infectados eliminan virus en las heces durante al menos dos semanas después del comienzo de la infección (Keenan y col., 1976). El hacinamiento, unas condiciones sanitarias deficientes y otros factores ambientales negativos influyen directamente sobre la incidencia de la enfermedad, como sucede con otras enteritis víricas. Existe una correlación directa entre la gravedad del cuadro clínico y la participación de otros agentes patógenos entéricos de diverso origen, como ya se mencionó anteriormente (Vandenberghe y col., 1980).

Se ha observado que los brotes clínicos aparecen más frecuentemente en la estación invernal, debido a la mayor estabilidad del agente etiológico a bajas temperaturas y protegido de la luz solar (Pensaert y Callebaut, 1978).

En algunos ensayos realizados con perros de experimentación de diverso origen, pudo demostrarse serológicamente la infección por CVC en un 20% de los casos (Binn y col., 1981).

En otros estudios realizados con perros de dueños particulares y de criadero, se constató que la seroprevalencia del CVC osciló entre el 15 y 25% y entre el 60 y 80%, respectivamente. En términos generales, puede concluirse que la incidencia en perreras es al menos el doble de la incidencia observada entre animales procedentes de una población abierta (Cartwright, 1973; Pensaert y Callebaut, 1978; Helfer-Baker y col., 1980; Osterhaus y col., 1980; Toma y Morailon, 1980; Rimmelzwaan y col., 1991; Tennant y col., 1991a).

En un estudio realizado en Alemania sobre sueros caninos recogidos en los años 1982, 1983 y 1988, se detectó la presencia de anticuerpos neutralizantes frente a CVC en un 50% de las muestras (con títulos bajos en su mayor parte). Asimismo, se pudieron detectar partículas víricas en las heces de animales diarreicos en un 7'7% de los casos. Esta notable diferencia entre la tasa de animales seropositivos y la cifra de aquellos que eliminan coronavirus en heces, sugiere que la mayor parte de las infecciones permanece de forma subclínica. Por tanto, es probable que los individuos portadores desempeñen un papel importante en la perpetuación de la enfermedad (Appel y col., 1979; Herbst y col., 1988).

Tennant y col. (1991b) describen cierta influencia de la edad en la tasa de seropositividad después de llevar a cabo una prospección serológica en un hospital de Liverpool. En este estudio se comunica que la mayor parte de los perros seropositivos frente al CVC contaba con más de dos años de edad.

Se han llevado a cabo algunos estudios comparativos para esclarecer la exposición de la población frente al CVC y al PVC. En una investigación realizada en EEUU, se detectaron títulos séricos frente a ambos virus en el 55'6% de los perros de criadero y en el 7'4% de los perros pertenecientes a familias (Helfer-Baker y col., 1980).

Las gastroenteritis producidas por el CVC no están sometidas a consideraciones de salud pública, ya que nunca se han descrito infecciones ni detección de anticuerpos específicos en humanos (Binn y col., 1981; Toma y col., 1982).

I.5. PATOGENIA

Después de la exposición oral, el virus llega al intestino delgado con mínimas pérdidas de infectividad (como ya se ha mencionado, es estable a pH ácido). El periodo de incubación es de 24 a 48 horas en condiciones experimentales, sin embargo, en la infección natural se ha observado que puede oscilar entre 1 y 4 días (Cartwright, 1973; Keenan y col., 1976). Este corto periodo de incubación se debe a que no es necesaria la diseminación sistémica del agente para acceder a su lugar específico de multiplicación.

Durante las 48 horas siguientes a la exposición, la infección se instaura en la zona proximal del duodeno. A partir esta fase, progresa distalmente hacia el resto del intestino delgado durante otros dos días más (Takeuchi y col., 1976).

El CVC coloniza los enterocitos de los dos tercios apicales de la vellosidad intestinal, causando mortalidad y descamación celular. Como consecuencia, se produce un acortamiento primario de las vellosidades, acompañado de la fusión de las mismas.

La penetración del virus en las células se ve favorecida por la capacidad de absorción de macromoléculas mediante pinocitosis que poseen los enterocitos durante el periodo neonatal, lo cual justificaría la mayor importancia de esta infección en los cachorros (Clark, 1959; Moon, 1972).

La descamación de las células epiteliales intestinales, junto a los viriones maduros liberados, constituyen la fuente de infección para los segmentos intestinales más caudales.

Asimismo, el daño celular en el ápice de la vellosidad induce una mayor proliferación de las células de las criptas (que no se ven afectadas), con el fin de regenerar y conferir funcionalidad al epitelio dañado por la multiplicación del virus (Hooper y Haelterman, 1969; Moon, 1978). Así, las vellosidades se van recubriendo de células cúbicas inmaduras que son, debido a sus características intrínsecas, resistentes a la infección por el CVC. Como consecuencia, la infección del epitelio intestinal es transitoria y el proceso en su conjunto tiene un carácter autolimitante.

La destrucción o disfunción de los enterocitos afectados y su sustitución por células inmaduras, reduce la actividad enzimática digestiva, dando lugar a la aparición de diarrea por un mecanismo de malabsorción.

La diarrea se ve incrementada a causa del aumento de la presión osmótica ejercida por la presencia de nutrientes no digeridos en la luz intestinal (Lewis y Philips, 1972; Graham y col., 1982). Además, los enterocitos inmaduros mantienen alguna de sus funciones secretoras, lo cual también contribuye a aumentar el contenido fluido en la cavidad (Butler y col., 1974; Kerzner y col., 1977).

La destrucción de los enterocitos afecta de forma directa al transporte de iones, de tal manera que se producen pérdidas de sodio, potasio, cloro, bicarbonato y agua. La deplección de bicarbonato conduce al desarrollo de un estado de acidosis. Este cuadro se ve agravado por el aumento de la actividad microbiana como respuesta a la fermentación que sufren los componentes lácteos no digeridos, así como a causa del incremento neto del

ácido láctico en situaciones de deshidratación. A estos cambios les siguen una situación de hipoglucemia, inducida por la disminución en la absorción intestinal, la inhibición de la gluconeogénesis y el incremento de la glicolisis (Lewis y col., 1975; Lewis y Philips, 1978).

El proceso diarreico se intensifica debido a la acidosis metabólica, la sobrecarga intestinal y el aumento de motilidad de la pared del colon.

Todos estos procesos tienen consecuencias especialmente graves en las primeras semanas de vida, en las que el animal cuenta con unas reservas de glucógeno mínimas, por lo que suele sobrevenir la muerte si no se actúa con rapidez para corregir los mencionados cambios fisiopatológicos.

El cuadro se agrava si además interviene el PVC, puesto que presenta tropismo por células en rápida división. Las células de la cripta tienen una función germinativa y secretora, debido a lo cual presentan normalmente un elevado índice mitótico. Este último se ve aún más incrementado durante la infección por el CVC (Everman y col., 1980; Appel, 1988).

La multiplicación del PVC sólo es posible cuando el sustrato celular se encuentra en fase de división exponencial, ya que necesita una polimerasa dependiente del ADN celular y que no puede ser codificada por el genoma vírico.

En este tipo de infecciones mixtas, en las que de alguna manera el CVC y el PVC actúan sinérgicamente, la reepitelización intestinal se ve muy dificultada.

Además de autolimitante, en general la infección única por CVC tiende a ser localizada. No existe viremia en sentido estricto y la diseminación se limita, por tanto, a los ganglios

linfáticos mesentéricos y muy ocasionalmente al hígado y al bazo.

La recuperación de la mucosa intestinal, desde el punto de vista morfológico y funcional, se suele producir entre 7 y 10 días después de la infección. Esta recuperación tiene lugar de forma simultánea al desarrollo de IgA secretora local. Como consecuencia, los signos clínicos desaparecen y la excreción de partículas víricas se reduce notablemente hasta cesar por completo. Es a partir de entonces cuando puede detectarse la presencia de anticuerpos neutralizantes en sangre circulante (alrededor del 14º dpi).

I.6. SINTOMAS Y LESIONES

La gravedad de los **síntomas** durante el curso de la enfermedad es muy variable. La infección puede cursar desde una forma inaparente hasta un cuadro mortal. Los animales jóvenes (entre 1'5 y 3 meses de edad) son los más gravemente afectados. La mayor parte de los individuos que presentan signos clínicos son menores de dos años de edad (Tennant y col., 1991b).

Generalmente, el proceso tiende a ser autolimitante y a no causar una alta mortalidad (Cartwright y Lucas, 1972; Vandenberghe y col., 1980; Carmichael y Binn, 1981).

Los síntomas suelen comenzar entre 1 y 3 días después de la exposición al virus. En primer lugar, los animales presentan letargia, depresión, anorexia y disminución de la consistencia de las heces (Carmichael, 1978). La diarrea aparece rápidamente y puede ir precedida o acompañada por vómitos. Estos últimos suelen ser de tipo bilioso, y remiten en la mayor parte de los casos transcurridas 24 ó 48 horas después del comienzo de la enfermedad.

Las heces presentan un color anaranjado o amarillo verdoso y la consistencia puede ser desde líquida hasta semisólida. Pueden contener moco y sangre en cantidad variable y poseen un olor fétido característico (Appel y col., 1979a). La duración de la diarrea puede abarcar desde varios días a un período mayor de dos semanas.

La mayor parte de los animales no presentan fiebre, pero ocasionalmente pueden aparecer temperaturas corporales elevadas.

La persistencia y gravedad de los síntomas se relaciona en gran medida con el estrés y la intervención de parásitos, bacterias, o infecciones por otros virus como el PVC.

La recuperación clínica tiene lugar habitualmente entre 7 y 10 días tras el comienzo de los síntomas entéricos. Sin embargo, en algunos casos puede sobrevenir la muerte por deshidratación y desequilibrio electrolítico, especialmente en los animales más jóvenes. Asimismo, pueden existir recidivas diarreicas hacia la 2ª ó 3ª semana después de la recuperación.

Al comienzo del proceso las **lesiones** se centran en el duodeno y primeras porciones del yeyuno. A medida que avanza el curso de la enfermedad, las lesiones se extienden distalmente hasta alcanzar el íleon. Normalmente sólo se ve afectado el intestino delgado, aunque se ha descrito la presencia de lesiones en enterocitos del colon tras la infección natural (Vandenberghe y col., 1980).

Macroscópicamente puede apreciarse dilatación de las asas intestinales, que se hallan repletas de material fecal de consistencia líquida y color verdoso amarillento. Además, suele existir congestión y hemorragia en la mucosa intestinal. Generalmente, los ganglios linfáticos mesentéricos están aumentados de tamaño y edematosos (Appel y col., 1979).

Las lesiones microscópicas más características consisten en atrofia y fusión de las vellosidades intestinales. Puede observarse la sustitución de los enterocitos del ápice de la vellosidad por células epiteliales cúbicas inmaduras.

Las criptas se encuentran dilatadas y parcialmente ocluidas debido a la presencia de un gran número de células de descamación. Puede observarse un aumento del número de células caliciformes. Por último, existe una importante infiltración celular en la lámina propia. (Keenan y col., 1976).

La disminución de la altura de las vellosidades intestinales y la elongación de las criptas son las lesiones más precoces y las de aparición más constante en los animales jóvenes. La infiltración celular de la lámina propia constituye un signo típico de enteritis.

I.7. DIAGNOSTICO

1.7.1. Antecedentes epizootiológicos

El **diagnóstico diferencial** de los cuadros de gastroenteritis canina de origen infeccioso requiere un análisis laboratorial completo. Las pruebas deben encaminarse hacia la detección de cualquiera de los posibles agentes etiológicos, ya que desde el punto de vista clínico estas enfermedades son indiferenciables. Así, principalmente se debieran considerar en el diagnóstico diferencial los siguientes procesos que cursan con diarrea: infecciones por parvovirus y rotavirus, algunas parasitosis inducidas por protozoos o nematodos e infecciones bacterianas como pueden ser las producidas por **Campylobacter sp.**

En el caso de las infecciones víricas, los brotes se caracterizan por su aparición brusca, su curso corto y la rápida

recuperación de los animales. La morbilidad suele ser elevada (incluso del 100% entre cachorros de 2 a 2'5 meses) y suele existir mortalidad.

En procesos causados por bacterias o parásitos, la aparición de las manifestaciones clínicas es más lenta y el curso de la enfermedad tiende a cronificarse, dando lugar a un deterioro progresivo de la salud del animal. La morbilidad no es tan elevada como en el caso anterior y en general no existe mortalidad.

La diarrea puede ser aguda y francamente hemorrágica desde el comienzo, como en el caso de la parvovirus, o manifestarse como una disminución en la consistencia de las heces, con escasa presencia de sangre, como suele ser el caso de los cuadros en los que intervienen bacterias y/o protozoos.

1.7.2. Diagnóstico laboratorial

Durante los últimos años, el diagnóstico de las gastroenteritis caninas se ha centrado en la detección de PVC, al mismo tiempo que se prestaba escasa atención al CVC como posible agente responsable de los cuadros analizados. Esta circunstancia se debe a que el PVC está considerado como uno de los patógenos entéricos más graves, y a que existen diversas pruebas para su diagnóstico disponibles comercialmente.

El CVC, así como otros virus entéricos caninos (ej: rotavirus canino), presenta cierto grado de dificultad para su aislamiento en cultivos celulares. Por otro lado, este virus induce una respuesta serológica sistémica muy baja debido a su replicación primordialmente intestinal, lo que representa otra dificultad sobreañadida en la realización del diagnóstico.

Así, en caso de disponibilidad, la ME es considerada como una de las técnicas de elección para la detección rápida de partículas de CVC en heces.

Durante la infección por CVC no se producen cambios significativos en los parámetros hemáticos o bioquímicos que sean útiles en el diagnóstico. La leucopenia es un hallazgo muy poco frecuente, a diferencia de lo que sucede en las infecciones por PVC.

No es imprescindible la confirmación de la infección por CVC para instaurar inmediatamente una terapia adecuada, pero siempre es muy recomendable la identificación del agente causal.

I.7.2.1. Detección del antígeno vírico

*** Microscopía electrónica**

La tinción negativa de suspensiones fecales durante la fase aguda de la enfermedad constituye el método más útil para el diagnóstico de infecciones entéricas por coronavirus (Schnagl y Holmes, 1978; Eugster y Sidwa, 1979; Hoshino y Scott, 1980; Field, 1982; Descoteaux y col., 1985). También es un método excelente para la identificación de los diversos agentes que pueden intervenir en caso de infección vírica múltiple (Roseto y col., 1980; Williams, 1980; Marshall y col., 1984).

Los resultados deben interpretarse con cautela, ya que es necesaria cierta experiencia en ME para evitar confusiones con los artefactos presentes con frecuencia en la preparación (Hammond y Timoney, 1983). Para solventar este problema y facilitar la identificación de las partículas, puede emplearse la técnica de inmunomicroscopía electrónica (IME). Esta última consiste en incubar la muestra fecal con suero hiperinmune anti-CVC. En caso positivo, las partículas se aglutinarán formando

inmunocomplejos (Kapikian y col., 1975; McFerran y col., 1978; Madeley, 1979). También puede emplearse una solución de proteína A para recubrir las rejillas, con el fin de incrementar las posibilidades de visualización (Svensson y col., 1983).

La ME se utiliza también para la detección de virus en cultivos celulares infectados cuando éstos presentan efecto citopático (ECP). Puede llevarse a cabo bien mediante tinción negativa del sobrenadante o bien por ultrasección del sedimento celular (Oshiro y col., 1971).

Por otro lado, esta técnica resulta útil en infecciones experimentales para la detección de la presencia de viriones y definición de lesiones sobre cortes histológicos. Estos se realizan a partir de intestino delgado, preferentemente íleon. En el citoplasma de las células infectadas pueden observarse partículas en diferentes estadios de maduración (Takeuchi y col., 1976; Larson y col., 1979).

*** Aislamiento en cultivo celular**

La identificación definitiva del agente etiológico responsable del cuadro diarreico en estudio, requiere su aislamiento en cultivo celular. Como ya se ha mencionado, ello presenta ciertas dificultades en el caso del CVC.

Las muestras más indicadas para el diagnóstico "in vivo" son las heces. En los casos "post-mortem", deberá recogerse el contenido intestinal junto con raspados de mucosa de la zona del íleon. Preferentemente, las muestras deben tomarse entre el primero y segundo día tras el comienzo de la diarrea. El motivo de ello reside en el corto período de multiplicación del CVC, aunque la eliminación vírica pueda persistir durante más de dos semanas (Binn y col., 1974; Keenan y col., 1976; Appel, 1988).

La línea celular A-72, de origen tumoral canino, parece la más adecuada para el aislamiento de este virus (Binn y col., 1980). Son necesarios al menos dos o tres pases ciegos para lograr el aislamiento primario de una cepa de campo.

El ECP inducido por el CVC es semejante al producido por otros coronavirus. Normalmente, para virus adaptados al crecimiento "in vitro", se manifiesta hacia el 2º día post-infección (dpi), pudiendo observarse la aparición de sincitios y redondeamiento celular. Estas manifestaciones preceden al desprendimiento del tapiz de la superficie del frasco. Este ECP puede ser neutralizado específicamente por suero anti-CVC (Binn y col., 1974).

*** Inmunofluorescencia Directa (IFD)**

Esta técnica puede resultar de gran utilidad bien para confirmar el diagnóstico "post mortem" a partir de cortes histológicos en congelación e improntas de intestino delgado, o bien para aplicarse con el mismo fin a cultivos celulares infectados (Keenan y col., 1976; Solorzano y Morin, 1978).

Las muestras de necropsia deben recogerse lo más rápidamente posible, debido a la autólisis que sufren las vellosidades intestinales después de la muerte.

La presencia de fluorescencia específica difusa en el citoplasma de los enterocitos infectados permite la identificación del antígeno vírico.

Las primeras células fluorescentes aparecen en el duodeno hacia el 2º dpi, para después observarse en la totalidad del intestino delgado entre el 4º y 10º dpi. El mayor número de células fluorescentes corresponde invariablemente al íleon (Keenan y col., 1976).

* ELISA

Con un desarrollo más reciente que las anteriores, esta técnica es idónea para el proceso de un gran número de muestras por su rapidez de ejecución y su mayor capacidad de automatizado.

Los enzimoimmunoensayos empleados para la detección de partículas pueden ser de captura o de competición. En el caso del CVC, el ELISA empleado en ensayos experimentales está tapizado con un suero felino anti-VPIF o con anticuerpos monoclonales específicos frente al CVC. La detección de las partículas se lleva a cabo mediante un anticuerpo igual al anterior conjugado con biotina (Rimmelzwaan y col., 1991; Tuchiya y col., 1991).

I.7.2.2. Detección de anticuerpos

Cuando únicamente se van a llevar a cabo pruebas serológicas para el diagnóstico del CVC, es necesario demostrar la existencia de seroconversión. Ello es especialmente recomendable en el caso de animales procedentes de poblaciones cerradas como los criaderos. En este tipo de instalaciones, donde la circulación del virus es más dinámica, el número de animales seropositivos suele ser elevado y el porcentaje de seroconversión puede considerarse como indicador epidemiológico (Helfer-Baker y col., 1980).

Sin embargo, cuando se trata de un área geográfica donde no se haya comunicado la presencia de este virus y en ausencia, por tanto, de vacunación de la población, una sola determinación serológica puede ser suficiente para demostrar la infección por CVC. En estas circunstancias, si además se acompaña de sintomatología clínica, el valor de un resultado serológico positivo es incontrastable.

Para demostrar la seroconversión, es necesaria la toma de dos muestras de suero con un intervalo de 2 ó 3 semanas (la primera de ellas durante la fase aguda de la enfermedad). Se considera como diagnóstico positivo un incremento de cuatro diluciones seriadas entre la primera y la segunda determinación (Pollock, 1983).

*** Seroneutralización**

En general, el nivel de anticuerpos neutralizantes frente al CVC es bajo, debido al carácter eminentemente localizado de la infección.

En las pruebas de seroneutralización se utilizan pequeñas dosis de virus, normalmente entre 30 y 50 $DI_{50}CT$. En este tipo de ensayos la línea celular A-72 ha proporcionado excelentes resultados empleando diversas cepas de CVC (Binn y col., 1980).

Se ha sugerido que esta prueba es la más específica para cuantificar la respuesta serológica frente al CVC (Bohl, 1981; Mochizuki y col., 1987).

*** Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

No es un método muy utilizado, a causa de su baja sensibilidad. La técnica consiste en el empleo, como sustrato antigénico, de cultivos celulares infectados con una dosis de CVC prefijada. Una vez añadida la muestra en estudio y revelada la reacción con un suero antiespecie conjugado con fluoresceína, la presencia de fluorescencia indicará un resultado positivo (Post y col., 1978; Miller y col., 1980).

* ELISA indirecto

Actualmente, existen una serie de "kit" inmunoenzimáticos para la determinación de anticuerpos frente al CVC, disponibles comercialmente y de manejo sencillo.

Las placas empleadas suelen estar tapizadas con CVC purificado. Para el revelado de la reacción se utiliza un suero antiespecie conjugado con peroxidasa.

En diversos estudios comparativos, se ha descrito que la sensibilidad de este método para este virus canino es superior a la de otras técnicas más convencionales como la seroneutralización (Osterhaus y col., 1980; Rimmelzwaan y col., 1991).

I.8. TRATAMIENTO

Los tratamientos aplicados en este tipo de procesos deben ir dirigidos a paliar los síntomas, de forma semejante a cualquier enteritis vírica.

El primer objetivo del tratamiento es la reposición de fluidos y electrolitos por vía endovenosa, ya que la deshidratación y el desequilibrio electrolítico pueden ser mortales por sí solos (Pollock y Zimmer, 1986).

En algunas ocasiones, conviene acompañar la sueroterapia con antibióticos de amplio espectro para controlar las infecciones bacterianas secundarias. El tratamiento antibiótico está especialmente indicado en los casos en los que exista sospecha de infección mixta con PVC, a causa de la inmunodepresión inducida por este último virus. También pueden ser beneficioso el aporte de protectores de la mucosa intestinal, como los preparados a base de pectina y caolín (Appel y col., 1980).

La administración de cualquier medicación por vía oral está contraindicada durante la fase aguda de la enfermedad, debido a la posibilidad de emesis y a la ralentización del vaciado gástrico.

Los antiespasmódicos colaboran en el control de la diarrea, aunque también pueden favorecer la absorción de endotoxinas bacterianas (Pollock, 1983).

A juicio del profesional clínico, el tratamiento puede completarse con la prescripción de estimulantes inespecíficos de la inmunidad y diversos complejos vitamínicos.

I.9. RESPUESTA INMUNITARIA. PROFILAXIS

Las proyecciones que forman la corona característica del CVC representan la porción más inmunógena del virus. Los anticuerpos que se inducen durante la infección van dirigidos mayoritariamente frente a estas estructuras.

Basándonos en estudios previos realizados con otros coronavirus entéricos (especialmente el VGPT), podría deducirse que la inmunidad más eficaz frente al CVC es la generada por la mucosa intestinal. Esta inmunidad local está mediada por la IgA intestinal y juega un papel principal en la protección frente a la infección (Curtis y Bourne, 1971; Gupta, 1971; Bohl y col., 1972; Appel, 1987; Pollock y Carmichael, 1990).

Debido a que no suele existir viremia, los anticuerpos séricos son escasamente relevantes en cuanto a la protección. La determinación de los niveles de este último tipo de anticuerpos es de gran utilidad para establecer el diagnóstico y la prevalencia de la enfermedad. Los títulos son muy variables entre los animales procedentes de poblaciones abiertas o de dueños

particulares (Helfer-Baker y col., 1980; Osterhaus y col., 1980).

Se han descrito diferencias serológicas entre distintos aislados de CVC, aunque no se han llevado a cabo ensayos de protección cruzada con estas cepas. Si sus diferencias antigénicas son significativas, puede suceder que los perros protegidos frente a un serotipo sean susceptibles a la infección por otro distinto (Appel y col., 1980). Algunos autores han constatado este hecho en el caso de los coronavirus murinos (Fleming y col., 1983; Talbot y Buchmeier, 1985).

Durante las primeras semanas de vida, la susceptibilidad del cachorro frente a la infección está condicionada por el nivel inmunitario pasivo. Este último está en función de la cantidad y momento del calostro ingerido y de la vida media de los anticuerpos maternos.

En diversos estudios realizados en criaderos de otros países, se ha podido comprobar que estos títulos son poco elevados entre cachorros lactantes y que se mantienen a niveles detectables durante las 4 ó 5 primeras semanas de la vida (Edsall, 1989). Los anticuerpos presentes en la leche materna pueden bloquear la infección por el CVC, aunque no es infrecuente observar una disminución en la consistencia de las heces en cachorros procedentes de perreras afectadas.

La inmunidad más eficaz se alcanza como consecuencia de la infección natural o experimental, ya que en estos casos el virus se multiplica activamente en los enterocitos. Este hecho no sucede tras la inoculación parenteral con CVC. Así, los animales que han padecido una infección natural o experimental resultan protegidos frente a las reinfecciones, a pesar de que puedan presentar un título sérico de anticuerpos menor que el de aquellos perros inoculados parenteralmente con CVC, ya sea éste vivo o atenuado (Edsall, 1989).

La aparición de anticuerpos con actividad neutralizante suele comenzar entre el 17° y el 21° dpi, coincidiendo con el cese de excrección vírica y la desaparición de los signos clínicos (Tennant y col., 1991a). La respuesta serológica alcanza valores máximos entre el 42° y el 60° dpi, y puede persistir hasta los 200 dpi (Cartwright, 1973; Keenan y col., 1976).

A pesar de existir reacciones serológicas cruzadas con el VGPT, este último virus no protege a los perros frente a la infección por el CVC. El VGPT es capaz de multiplicarse en las células intestinales caninas y se elimina en heces durante aproximadamente 14 dpi (Larson y col., 1979). Sin embargo, el desafío con el CVC induce una infección intestinal y no se aprecia ninguna respuesta anamnésica humoral. De modo semejante, y a pesar del parentesco antigénico entre el CVC y el VPIF, éste último tampoco protege frente a la infección por el virus canino tras la infección experimental con el virus felino por vía oral o intraperitoneal (Appel y col., 1980).

I.9.1. Profilaxis sanitaria

Para el control de la enfermedad en las perreras es necesaria la aplicación de medidas higiénicas, debido al carácter marcadamente contagioso de la enfermedad y a la gran cantidad de partículas víricas infectivas eliminadas en las heces de los animales. Cuando el CVC se establece en un criadero, en un principio puede originar un brote agudo de características semejantes a las mencionadas anteriormente. En estas circunstancias, debe practicarse un estricto aislamiento de los animales afectados y mantener una higiene esmerada de estas dependencias.

Una vez instaurada la infección en el criadero, el virus circulará de forma subclínica entre los animales adultos, como ya se ha demostrado para los coronavirus porcinos y bovino

(Garwes, 1980; Heckert y col., 1991). En este caso, una de las medidas más recomendables es la desinfección exhaustiva y periódica de las instalaciones con soluciones de hipoclorito o formalina (Everman y col., 1989).

I.9.2. Profilaxis médica

La vacunación frente al CVC, aunque sólo proporcione una protección parcial, desempeñaría un importante papel en la reducción de la gravedad de los cuadros producidos por infecciones mixtas con el PVC.

Pueden desglosarse dos niveles de actuación para aplicar los programas de vacunación. El primero comprendería la vacunación de hembras reproductoras para garantizar la inmunidad del cachorro. El segundo nivel de actuación implicaría la vacunación sistemática de todos los efectivos para mantener unos niveles adecuados de inmunidad.

Con estas medidas, se lograría disminuir la incidencia de la enfermedad clínica y la eliminación del virus al medio ambiente (Haelterman, 1965; Welliver y Ogra, 1978).

En 1983 el Departamento de Agricultura estadounidense (USDA) aprobó una vacuna de CVC atenuado. El empleo de este producto junto con otras vacunas víricas atenuadas, provocó la aparición de reacciones adversas de tipo neurológico (encefalitis), lo que motivó su retirada del mercado (Martin, 1985).

En 1985 se registró otra vacuna con virus inactivado (Duramune CV-K, Fort Dodge Laboratories), disponible actualmente en el mercado, ya que resulta segura incluso en combinación con otros virus atenuados. La eficacia de este producto se analizó empleando el método de reducción de la infección intestinal. En los ensayos pudo observarse una menor eliminación de virus en los

cachorros vacunados (Edwards y col., 1985; Fulker y col., 1986).

En la práctica, se han obtenido resultados positivos con la aplicación de esta vacuna en criaderos caninos con problemas de gastroenteritis. Una de las pautas de vacunación recomendadas consiste en administrar tres dosis de vacuna: la primera a los 45 días, la segunda a los 60 y la tercera a los 90 días de vida. Es conveniente la revacunación anual.

La tendencia actual en cuanto a los protocolos de inmunización, se orienta hacia la reducción del número de inmunizaciones y la inclusión del CVC en vacunas polivalentes.

En cuanto a las perspectivas de futuro, la elaboración de vacunas puede sufrir a corto plazo una transformación drástica merced a los últimos avances tecnológicos. Los objetivos finales siempre incidirán en la mejora de la seguridad, la eficacia y la calidad de los productos inmunizantes. Algunos de los métodos empleados para el desarrollo de vacunas de última generación tienen su base en la expresión de antígenos protectores en hospedadores procarióticos o eucarióticos y la producción de péptidos sintéticos. Con el desarrollo de la tecnología de ADN recombinante, es posible producir antígeno vírico mediante la expresión de genes que codifican para proteínas antigénicas en determinadas células hospedadoras. En estos casos, se utilizan antígenos que no se multiplicarán en los tejidos del hospedador, aunque existen otras opciones, como el empleo de virus mutantes atenuados para la elaboración de vacunas vivas. Estos tipos de vacunas no conllevan mayores problemas en cuanto a la seguridad que las convencionales atenuadas o inactivadas. El riesgo aumenta cuando se emplean microorganismos vectores manipulados mediante ingeniería genética y portadores de genes heterólogos, ya que puede producirse la transferencia de estos genes a los microorganismos de campo (Kimman, 1992).

II. JUSTIFICACION Y FINES

II. JUSTIFICACION Y FINES

En los últimos 50 años, la práctica clínica de pequeños animales ha ido cobrando una creciente importancia dentro de la medicina veterinaria. Esta evolución ha seguido un camino paralelo al incremento en la valoración y la comercialización de los animales de compañía. Actualmente, este tipo de animales (y en concreto la especie canina) desempeña un papel cada vez más destacado en nuestra sociedad. Dentro del mismo, podríamos destacar aspectos afectivos, educativos y terapéuticos, así como la realización de algunos trabajos especializados.

Los cuadros de gastroenteritis son un problema frecuente en el ejercicio clínico diario. La aparente contradicción entre el aumento de los casos de gastroenteritis en perros jóvenes y el generalizado nivel de inmunidad de la población canina frente al PVC (principal virus patógeno entérico), hizo que nos animásemos a abordar este tema. Hasta aquel momento no se habían emprendido estudios sobre el CVC en España.

El primer objetivo de nuestro trabajo fue poner de manifiesto la presencia del CVC en nuestro país y, en su caso, compararlo sus características estructurales con una cepa americana de referencia.

En segundo lugar, nos propusimos aportar algunos datos acerca de la situación epidemiológica de las gastroenteritis producidas por CVC, llevando a cabo una pequeña encuesta serológica sobre poblaciones caninas de distinto origen.

Por otra parte, se intentaría poner a punto, normalizar y comparar diversas técnicas serológicas que resultasen ser prácticas, sencillas y fiables para el diagnóstico rutinario.

Por último, nos propusimos estudiar y comparar la antigenicidad del virus completo y de sus distintas proteínas estructurales mediante la valoración de la respuesta inmunitaria inducida en perros de experimentación. La cuantificación de la respuesta serológica se llevaría a cabo "in vivo" e "in vitro" empleando para ello distintos métodos.

El último fin de estos ensayos radicaría en la apertura de nuevas posibilidades para el control y prevención de la enfermedad. En concreto, podría considerarse la utilización de alguna proteína estructural como posible antígeno para la elaboración de una vacuna de subunidades.

III. MATERIAL Y METODOS

III. MATERIAL Y METODOS

III.1. REACTIVOS Y SOLUCIONES

III.1.1. Reactivos

Acetato de Uranilo	MERCK
Acido clorhídrico	MERCK
Acido acético	MERCK
Acido 3 dimetilaminobenzoico (DMAB)	SIGMA
Acido etilendinitrilotetraacético (EDTA)	MERCK
Acido fosfotúngstico	MERCK
Acido sulfúrico	MERCK
Acrilamida	BIO-RAD
Anfotericina B	GIBCO
Azul de Bromofenol	SIGMA
Azul brillante de Coomasie	SERVA
Beta-mercaptoetanol	BIO-RAD
Beta-propiolactona (BPL)	SIGMA
Bicarbonato sódico	MERCK
Bisacrilamida	BIO-RAD
Carbonato disódico	MERCK
Citrato de plomo	MERCK
4-Cloronaftol	MERCK
Cloruro magnésico	MERCK
Cloruro potásico	MERCK
Cloruro sódico	MERCK
Colimicina	SYNTEX
Dialiltartadiazina (DATD)	BIO-RAD
Dimetil sulfóxido (DMSO)	MERCK
Dodecil sulfato sódico (SDS)	SIGMA
EDTA disódico	MERCK
Epon-Araldita	SERVA
Estreptomycin	FLOW

Etanol 70°	MERCK
Formvar (polyvinyl formal)	AGAR ScL
Fosfato disódico	MERCK
Fosfato monopotásico	MERCK
Gamma-globulina de ratón	GENELAB
Gentamicina	FLOW
Glicerol	MERCK
Glicina	MERCK
Glutaraldehido	MERCK
Hidróxido de sodio	MERCK
Kanamicina	NORMON
Leche en polvo desnatada	NESTLE
Medio Leibovitz (L-15)	GIBCO
Metanol	MERCK
Metil 2 benzotiazolinona hidracina (MBTH)	SERVA
Nistatina	SIGMA
Penicilina	FLOW
Peróxido de hidrógeno	PANREAC
Persulfato amónico	MERCK
Proteína A-peroxidasa	SIGMA
Sacarosa	MERCK
Seroalbúmina bovina (SAB)	MERCK
Suero fetal bovino (SFB)	FLOW
Sulfato cúprico pentahidratado	MERCK
Tartrato sódico potásico	MERCK
Tetrametil etilendiamina (TEMED)	SIGMA
Tetróxido de Osmio	SERVA
Tripsina	FLOW
Tris (hidroximetil) aminometano (TRIS)	MERCK
Tritón X-114	SIGMA
Tween 20	MERCK

III.1.2. Soluciones

Tampón fosfato salino (PBS) pH 7'2 de **uso general:**

ClNa	137	mM
KCl	2'7	mM
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	8	mM
KH ₂ PO ₄	1'4	mM

Solución de antibióticos para **medios de cultivo:**

Penicilina	200	UI/ml
Estreptomina	100	μg/ml
Colimicina	300	UI/ml
Kanamicina	200	μg/ml
Nistatina	50	UI/ml

Solución de tripsina-versene:

NaCl	16	g
KCl	0'8	g
Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	0'24	g
KH ₂ PO ₄	0'12	g
Glucosa	2'2	g
R rojo fenol	0'02	g
H ₂ O desionizada	c.s.p.	1 l
Tripsina	2'5	g
Versene	0'3	g
CO ₃ HNa	1'4	g
Penicilina	2 x 10 ⁵	UI
Colimicina	4 x 10 ⁵	UI
Estreptomina	0'160	g

Tampón TNE para conservación de **virus purificado:**

TRIS-HCl	pH 7'5	10	mM
NaCl		5	mM
EDTA-Na ₂		1	M

Tampón carbonato-bicarbonato pH 9'6 para fijación de antígeno en el **enzimoinmunoensayo (ELISA)**:

CO_3Na_2	15 mM
CO_3HNa	27 mM

Tampón de lavado (ELISA):

Tween 20	0'05 %
----------	--------

Tampón para dilución de sueros (ELISA):

PBS	70 %
SFB	30 %
Tween 20	0'05 %

Tampón fosfato 0'1 M pH 7:

KH_2PO_4	0'04 M
Na_2HPO_4	0'06 M

Sustrato para revelado (ELISA):

Solución A:

DMAB (Acido 3 dimetilaminobenzoico)	13'315 g
Tampón fosfato 0'1 M pH 7	c.s.p. 1 l

Solución B:

MBTH (Metil 2 benzotiazolinona hidracina)	0'365 g
Tampón fosfato 0'1 M pH 7	c.s.p. 1 l

(Para el revelado de las placas se mezclaron 10 ml de cada solución con 5 μl de H_2O_2).

Soluciones para **valoración de proteínas** (Método de Lowry):

Solución A (sin NaOH para proteínas insolubles):

Na ₂ CO ₃	2	%
Tartrato sódico potásico	0'02	%
NaOH	0'4	%

Solución B:

Sulfato cúprico pentahidratado	0'5	%
--------------------------------	-----	---

Soluciones para **electroforesis en geles de poliacrilamida**
(SDS-PAGE):

Solución A:

TRIS	3	M
ClH	1	N

Solución B:

TRIS pH 7	1	M
SDS	20	%

Solución C:

Acrilamida	28	%
DATD	0'735	%

Solución C':

Acrilamida	30	%
Bisacrilamida	0'8	%

Gel separador (pH 8'5, 15% acrilamida y 1 mm de espesor):

Solución A	4'5	ml
Solución C	19	ml
H ₂ O desmineralizada	2'8	ml
SDS 20%	0'18	ml
Persulfato amónico 0'14%	9	ml
TEMED	13	μl

(La única variación para los geles separadores de acrilamida-bisacrilamida son los volúmenes de solución C' (17'75 ml) y de H₂O destilada (4'05 ml).

Gel apelmazador (pH 7):

Solución B	1'50 ml
Solución C	1'35 ml
H ₂ O desmineralizada	3'15 ml
Persulfato amónico 0'14%	6 ml
TEMED (Tetrametiletilendiamina)	10 μ l

Patrón de comercial de proteínas:

	Pm (kD)	μ g/vial
Fosforilasa b	94.000	64
Seroalbúmina bovina	67.000	83
Ovoalbúmina	43.000	147
Anhidrasa carbónica	30.000	83
Inhibidor de tripsina de soja	20.000	80
Alfa-lactoalbúmina	14.000	121

Tampón de disociación de proteínas (Solución de ruptura (SR), 4x):

TRIS-HCl pH 7	58 mM
SDS 20%	2'3%
Beta-mercaptoetanol	2 %

Solución de ruptura para células (SR(-)):

SDS 20%	50 %
Tris 1M pH 7	25 %
H ₂ O destilada	25 %

Tampón de electroforesis (pH 8'3):

TRIS	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0'1 %

Solución para fijación de proteínas en geles:

Metanol	25	%
Acido acético	7'5	%
H ₂ O destilada	67'5	%

Solución de tinción para proteínas en geles:

Azul brillante de Coomasie (soluc. 0.25%)	45'4	%
Metanol	45'4	%
Acido acético	9'2	%

Solución de antibióticos para tratamiento de sueros en la seroneutralización (SN):

Gentamicina	0'08	%
Anfotericina B	2	%

Tampón de **transferencia**:

Tris	0'02	M
Glicina	0'19	M
Metanol	66'6	%

Sustrato para revelado en la técnica de **inmunodetección de proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa (ID)** :

PBS	10	ml
Metanol	2	ml
4-Cloronaftol	6	mg
H ₂ O ₂	4	μl

Vacuna comercial CVC (Duramune Cv-K, Fort Dodge)

Composición/dosis:

CVC (cepa TN 449)	900	μl
Adyuvante 1	4	μl
Adyuvante 2	29	μl
EDTA	2	μl
NaOH 1N	0'8	μl

III.2. MATERIAL FOTOGRAFICO

Los reveladores empleados fueron: D-76 de Kodak, Finofen de Valca y Rodinal S de Agfa. Como fijadores se usaron: fijador ácido rápido de Kodak o Agefix de Agfa. Los papeles fotográficos fueron: Brovira Speed de Agfa e Ilfospeed de Ilford.

III.3. RECOLECCION Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

III.3.1. Antecedentes clínicos

La toma de muestras patológicas se realizó a partir de animales con síntomas de gastroenteritis y, siempre que fue posible, se llevó a cabo al comienzo de la diarrea. La sospecha de una etiología vírica se basó en la aparición brusca y en la rápida difusión del proceso entre los cachorros de las distintas camadas, en el caso de los criaderos analizados. La edad media de afección osciló entre 1'5 y 2'5 meses. Los animales adultos generalmente no mostraron síntomas clínicos.

III.3.2. Heces

Fueron recogidas un total de 75 muestras de heces de campo. De ellas, 15 procedieron de perros enfermos llevados a la consulta pública de la Facultad de Veterinaria de la U.C.M.. Otras 30 muestras se recolectaron entre animales de distintos criaderos de Madrid con un historial continuado de diarreas entre sus camadas. De estas, 20 se obtuvieron en un criadero al que en adelante nos referiremos como "P".

Las 30 muestras de heces restantes se recogieron semanalmente en el Centro de Protección Animal de Cantoblanco (Madrid). Este muestreo se realizó con el fin de comprobar la existencia o no de prevalencia de infección por CVC en un

población escogida al azar, no vacunada y aparentemente sana. La procedencia, raza y edad de estos animales fue de diversa índole.

Por otra parte, se recolectaron 140 muestras de heces procedentes de los 10 animales de experimentación empleados en nuestro ensayo. Estas se recogieron durante los 14 días siguientes a la contraprueba con el fin de evaluar el período de eliminación de partículas víricas, como se detalla en el apartado III.11.4.

Las heces se diluyeron 1/5 en tampón fosfato (PBS) pH 7'2, y tras su homogeneización con vortex, se centrifugaron a 3000 rpm (Sorvall, rotor SS-34) durante 15 minutos para eliminar los restos más groseros. El posterior tratamiento de los sobrenadantes dependió del tipo de técnica diagnóstica empleada.

Para la realización de microscopía electrónica (ME), los sobrenadantes se ultracentrifugaron a 35000 rpm en rotor SW-40 durante una hora, con el fin de concentrar las posibles partículas víricas. Los sedimentos resultantes fueron resuspendidos en 100 μ l de PBS pH 7'2.

Para el aislamiento en cultivo celular a partir de las muestras, se procedió a la filtración de los sobrenadantes con una membrana de acetato de celulosa (Minisart NML) de 0'22 μ m de poro.

III.3.3. Sueros

En total se analizaron 51 sueros de campo. De ellos, 26 correspondieron a 8 hembras reproductoras del criadero "P". Se obtuvieron en 4 sangrías sucesivas con 20 días de intervalo. ~~En~~ 25 sueros restantes procedieron de la misma población canina encuestada en el Centro de Protección Animal de Cantoblanco.

Asimismo, se recolectaron otras 140 muestras de suero procedentes de los 10 animales empleados en la prueba de infección experimental y correspondientes a las 14 tomas de sangre realizadas a lo largo de la misma (apartado III.11.3.).

Las muestras de sangre procedentes de las distintas poblaciones caninas se mantuvieron a 4°C durante una noche para la obtención de suero. Posteriormente fueron centrifugadas a 1600 x g durante 15 minutos. Los sueros se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Todas estas muestras fueron analizadas mediante distintas técnicas serológicas, como se detalla en el apartado III.10.

III.4. CEPAS DE VIRUS

Se utilizó como virus de referencia la cepa s3786/6 de CVC, cultivado en la línea celular A-72. Fue cedido amablemente por el Dpto. de Sanidad Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) y en origen por el Dr. L.E. Carmichael del James A. Baker Institute, Universidad de Cornell, Nueva York.

III.5. CULTIVOS CELULARES

III.5.1. Líneas celulares empleadas

Para el cultivo de virus se empleó la línea celular A-72 de estirpe tumoral canina, procedente de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland (CRL 1542).

Las células se mantuvieron en frascos de cultivo de 25, 75, 150 y 175 cm² de superficie (Falcon Plastics, Corning y Nunc).

Para la tinción de los cultivos celulares se empleó un método metacromático basado en el de May-Grünwald-Giemsa.

III.5.2. Mantenimiento de las líneas celulares

En el mantenimiento de la línea se empleó medio de cultivo Leibovitz (L-15, Gibco) suplementado con antibióticos. Para el crecimiento se añadió al medio de cultivo un 15% de suero fetal bovino (SFB) y un 5% para mantenimiento.

Se realizaron pases seriados en frascos Falcon de cultivo. Cuando el tapiz se tornó confluyente (lo que sucedió habitualmente 24 horas después del pase anterior) se procedió al subcultivo. Para ello, las células se desprendieron con una solución de tripsina-versene en PBS sin sales de calcio y magnesio. Una vez dispersas totalmente, se procedió a neutralizar la acción de la tripsina mediante la adición de un 5% de SFB, centrifugándose posteriormente a 500-1000 xg durante 15 minutos. El sedimento obtenido se resuspendió en medio de cultivo. El cálculo de la concentración celular se llevó a cabo por recuento en una cámara de Neubauer y se ajustó la concentración celular a 3×10^5 células/ml. Los cultivos se incubaron a 37°C hasta el momento de su utilización.

III.5.3. Conservación de las líneas celulares

Se empleó N₂ líquido para la conservación de la línea celular A-72. El tapiz celular se desprendió con tripsina y se centrifugó a 500-1000 xg durante 15 minutos. El sedimento se resuspendió en medio de cultivo L-15 con un 15% de SFB y un 10% de DMSO, ajustándose el volumen de manera que las células se encuentren a una concentración final de $4-5 \times 10^6$ células/ml. La suspensión celular se dispuso en ampollas de congelación (1 ml/ampolla) y se mantuvieron una hora a 4°C. Tras ello, fueron sometidas a vapores de N₂ durante 15 minutos, para introducirse

finalmente en el tanque de congelación.

La descongelación de las células se llevó a cabo de una forma brusca, mediante inmersión de las ampollas en agua a 37°C. A continuación, se depositaron en un frasco de cultivo de 25 cm² de superficie con medio de cultivo y suero. El medio se renovó a las 24 horas con el fin de eliminar el DMSO, debido a su efecto tóxico sobre las células.

III.6. SUEROS DE REFERENCIA

Se emplearon dos sueros control. Uno hiperinmune anti-CVC y otro procedente de animales SPF (Specific Pathogen Free), ambos obtenidos en perro. Los dos fueron amablemente proporcionados por Cofal S.A. y en origen por laboratorios Fort Dodge de Iowa (EEUU).

III.7. METODOS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA (ME)

III.7.1. Tinción negativa. Inmunomicroscopía electrónica (IME)

La microscopía electrónica (ME) se llevó a cabo empleando la técnica de tinción negativa. Se aplicó rutinariamente a las muestras de heces y a los sobrenadantes de los cultivos celulares infectados, con el fin de confirmar el diagnóstico. También se empleó para comprobar la pureza y concentración del virus purificado (Haschemeyer y Myers, 1972; Nermut, 1971; Doane y Anderson, 1987).

Las muestras de heces se prepararon siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.3.2.

Para confirmar morfológicamente el aislamiento del virus en cultivos celulares, se recogieron los cultivos inoculados tras un ciclo de congelación-descongelación, cuando en ellos se evidenció el efecto citopático. Se centrifugaron a 3000 rpm (Sorvall, rotor SS-34) durante 15 minutos, con el fin de eliminar los restos celulares (Hammond y col., 1981).

La inmunomicroscopía electrónica (IME) se llevó a cabo incubando durante una hora a 37°C las muestras así preparadas con un volumen igual de suero hiperinmune anti-CVC (Doane, 1974; Bethiaume y col., 1981).

Las muestras se visualizaron sobre rejillas recubiertas con una película de formvar, sombreadas con carbón y contrastadas con ácido fosfotúngstico al 2%, pH 7'1. Se utilizó para ello un microscopio electrónico Jeol 100B.

III.7.2. Cortes ultramicroscópicos

Para realizar el seguimiento del ciclo de infección en cultivos celulares, se emplearon monocapas de 14, 24 y 48 hpi. Se fijaron con glutaraldehído al 1'5% pH 7'2 y tetróxido de Osmio (OsO_4) al 1%. Posteriormente se procedió a la deshidratación con series de etanol e inclusión en una mezcla de EPON-Araldita. Los cortes ultramicroscópicos, de aproximadamente 2 μ de grosor, se obtuvieron utilizando un ultramicrotomo Sorvall MT-2. Por último, fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo antes de la observación.

III.8. PRODUCCION DE VIRUS EN CULTIVOS CELULARES

III.8.1. Aislamiento de virus

Para el aislamiento de virus a partir de heces, se seleccionaron aquellas muestras que previamente habían resultado sospechosas mediante microscopía electrónica (ME). Posteriormente, se procesaron siguiendo el método descrito en el apartado III.3.2.

El filtrado se inoculó en un tapiz confluyente de células A-72 de aproximadamente 24 horas. Tras un período de adsorción de 1'5 horas a 37°C, fue retirado el inóculo y se añadió medio de mantenimiento. La observación del curso de la infección se llevó a cabo diariamente durante un periodo de 72 a 96 horas.

La ausencia de efecto citopático (ECP) después de dos pases ciegos se consideró como resultado negativo. Cuando se observó ECP, el diagnóstico se confirmó mediante ME.

La cepa aislada de campo con la que se trabajó en adelante se denominó P-Madrid/90.

III.8.2. Cálculo de la multiplicidad de infección (m.i.)

La multiplicidad de infección (m.i.) viene determinada por la relación entre el número de partículas víricas y el de células que han de infectar. El cálculo numérico se realiza multiplicando el título del inóculo por el volumen del mismo que se añade a las células y dividiendo por el número de células del cultivo que se infecta.

III.8.3. Obtención de inóculos víricos

Para la obtención de inóculos, se infectaron monocapas de células A-72 confluentes de aproximadamente 24 horas. La producción de virus se realizó empleando la cepa aislada de campo P-Madrid/90 o la de referencia s3786/6. La m.i. osciló entre 0'1 y 1 dosis infectiva 50 en cultivo de tejidos (DI_{50CT})/célula. Tras un período de adsorción de 1'5 horas a 37°C, se añadió medio de mantenimiento sin retirar el inóculo.

La aparición del ECP se situó hacia las 24 horas post-infección (hpi) y se estimó entre un 20-30%.

Los sobrenadantes de estos cultivos se centrifugaron a 6500 rpm en rotor SW-28 durante 15 minutos, con el fin de eliminar los restos celulares. Se añadió un 15% de SFB para una mejor conservación del virus y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

III.8.4. Titulación de los inóculos (DI_{50CT})

Las titulaciones se llevaron a cabo en placas de cultivo de 96 pocillos con fondo plano (Nunc). El inóculo se diluyó en base 10 desde 10^{-1} hasta 10^{-10} . Se empleó una concentración de células A-72 equivalente a 2×10^5 células/ml. Se depositaron 50 μ l de esta suspensión en cada pocillo y 25 μ l de cada dilución de inóculo, completándose el volumen con 25 μ l de medio de mantenimiento.

Las placas se incubaron a 37°C en estufa de CO₂ (Heraeus) y se observaron diariamente. La lectura definitiva se realizó en base al ECP a las 72 hpi. El cálculo de la dosis infectiva 50 en cultivo de tejidos (DI_{50CT}) se efectuó mediante el método de Reed y Muench (1938).

III.8.5. Purificación de virus

Para la producción de virus destinado a la purificación, se procedió como se describe en el apartado III.8.3., a excepción de la m.i. que en este caso fue de 10 DI₅₀CT/célula. Se emplearon para ello las cepas s3786/6 y P-Madrid/90. Cuando los cultivos presentaron un ECP del 80-90% (a las 48 hpi aproximadamente) fueron sometidos a un ciclo de congelación-descongelación a -20°C. Con el fin de eliminar restos celulares, se centrifugaron a 6500 rpm en rotor SW-28 durante 30 minutos. El virus se sedimentó mediante ultracentrifugación a 24000 rpm utilizando el mismo rotor durante una hora. El sedimento fue resuspendido en tampón TNE y se mantuvo toda la noche a 4°C, con el objeto de disminuir la agregación de las partículas.

Para la purificación se empleó un gradiente continuo de sacarosa 20-60% (p/p). El virus semipurificado se ultracentrifugó a través de él durante 4 horas a 22500 rpm en rotor SW-40. La/s banda/s se recogieron en un volumen de 8 ml de tampón TNE. Para eliminar la sacarosa, de nuevo se ultracentrifugó a 24000 rpm en rotor SW-40 durante 1'5 horas. El virus sedimentado se conservó resuspendido en 100 µl del mismo tampón a -80°C hasta su utilización.

III.8.6. Titulación del virus purificado (ELISA)

Para la titulación del virus purificado se prepararon diluciones del mismo en base 2 desde 1/100 hasta 1/1600, en tampón carbonato-bicarbonato pH 9'6. Se emplearon placas de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano (Dynatech). El tapizado se llevó a cabo depositando 100 µl de cada dilución de virus por pocillo, seguido de adsorción durante 16 horas a 4°C. El antígeno no fijado se eliminó mediante 4 lavados utilizando agua destilada con Tween 20 al 0'5% (v/v).

Como controles positivo y negativo, se emplearon un suero hiperinmune anti-CVC y otro procedente de animales SPF, respectivamente. Cada serie de antígeno fue incubada en presencia de un suero control diluido 1/30 en tampón PBS para dilución de sueros. El resto del ensayo se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.10.2.2.

III.9. PROTEINAS VIRICAS: OBTENCION, VALORACION Y ANALISIS

III.9.1. Solubilización de proteínas con Tritón X-114

La obtención de las proteínas estructurales del virus se realizó según el método descrito por Bordier en 1981, con algunas modificaciones. La solubilización se llevó a cabo empleando el detergente no iónico Tritón X-114 precondensado. Este agente forma soluciones homogéneas a 0°C, mientras que por encima de 20°C se separa en dos fases: acuosa y detergente. Las proteínas se extrajeron en base a sus características hidrofílicas o anfifílicas.

Para la solubilización se utilizó CVC purificado, y se valoró posteriormente la pureza de los productos obtenidos mediante técnicas de electroforesis y densitometría.

III.9.2. Valoración de proteínas

Se siguió el método descrito por Lowry y col. (1951) para proteínas solubles e insolubles. En el caso de las proteínas insolubles, la muestra (CVC purificado) se disolvió en NaOH 1N y fue incubada 30 minutos a 37°C. No se incluyó NaOH en la solución alcalina de la primera reacción.

El método para la valoración de proteínas solubles se aplicó a la fase acuosa que resultó del tratamiento con Tritón X-114. No fue posible la aplicación de este método a la valoración de las proteínas N+M, ya que éstas se encontraban unidas al detergente.

Como proteína patrón se utilizó gamma-globulina de ratón (1'45 mg/ml) diluida en el tampón correspondiente a cada muestra.

III.9.3. Análisis de proteínas

III.9.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis de proteínas se realizó en geles discontinuos de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE).

Los dos tipos de geles separadores tuvieron un 15% de acrilamida en su composición, pero el agente intercalante fue distinto (bisacrilamida y DATD, respectivamente). La proporción de acrilamida en el gel apelmazador fue del 3'5% en todos los casos.

Se emplearon dos tamaños de soporte: uno de 28 x 24 cm y otro de 14 x 8 cm para minigeles.

Los pesos moleculares de las distintas proteínas estructurales del CVC aislado fueron estimados mediante la comparación con un patrón comercial (Pharmacia).

Las distintas muestras fueron solubilizadas en tampón de disociación de proteínas (Solución de Ruptura (SR)) y se sometieron a desnaturalización durante 2 minutos a 100°C. Antes de ser depositadas en cada pocillo, se añadió glicerol y azul de

bromofenol (un 10% del volumen total de la muestra cada uno).

La electroforesis se desarrolló a una intensidad constante entre 10 y 20 mA durante toda la noche.

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se sometieron a un proceso de tinción en agitación durante una hora a temperatura ambiente. La fijación se llevó a cabo durante varias horas también en agitación a 37°C.

III.9.3.2. Análisis densitométrico

Esta técnica se aplicó al virus completo (cepa P-Madrid/90) y a las distintas proteínas por separado, obtenidas tras el proceso de solubilización con Tritón X-114, con el fin de valorar su pureza. En el primer caso sirvió además para analizar la proporción relativa de las distintas proteínas estructurales del CVC aislado. En el segundo caso, también se empleó para valorar el rendimiento de obtención de las proteínas estructurales durante el proceso de solubilización.

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo sobre geles de poliacrilamida, mediante un proceso de reflexión de láser a 550 nm en un densitómetro Shimadzu CS-9000.

III.9.3.3. Análisis mediante inmunodetección de proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa (ID)

La técnica de ID se empleó en este caso para completar la identificación de la cepa de campo. Se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.10.3. En la electroforesis previa se utilizó la cepa de campo y el CVC de referencia. Para comprobar la identidad entre las proteínas de las cepas analizadas, las membranas se incubaron con suero hiperinmune de referencia.

III.10. METODOS SEROLOGICOS

III.10.1. Seroneutralización

Previamente a cada prueba de seroneutralización, los sueros se trataron con una solución de gentamicina y anfotericina B (v/v). Tras una incubación a 4°C durante toda la noche, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm en una microcentrifuga Sorvall MC12C durante 20 minutos, con el fin de eliminar posibles contaminaciones bacterianas.

Los ensayos de seroneutralización se llevaron a cabo en placas de cultivo de 96 pocillos con fondo plano (Nunc). El inóculo se diluyó adecuadamente empleando medio L-15 hasta obtener 100 DI₅₀CT en 25 µl.

Los sueros fueron diluidos en base 2 desde 1/8 hasta 1/4096 utilizando el mismo medio. Se depositaron 50 µl de cada dilución por pocillo y después 25 µl del virus. Tras una incubación a 37°C durante 1 hora en estufa de CO₂, se completó el volumen con 25 µl de medio L-15 por pocillo.

Se empleó una concentración de células A-72 equivalente a 15 x 10⁴ células/ml y se depositaron 100 µl de esta suspensión en cada pocillo. Las placas se mantuvieron a 37°C en un incubador de CO₂ durante 72 horas. La lectura se realizó mediante la valoración del ECP para determinar la dilución límite capaz de neutralizar 100 DI₅₀CT de CVC, según el método de Hsiung y Fong (1982).

III.10.2. Técnicas inmunoenzimáticas (ELISA indirecto)

III.10.2.1. ELISA comercial

Se utilizó un "kit" comercial inmunoenzimático para la detección de anticuerpos específicos frente a CVC (Clark KVC-100). Las placas se comercializan ya tapizadas con antígeno inactivado.

Como conjugado se empleó un suero anti IgG de perro producido en cabra y marcado con peroxidasa. El cromógeno fue orto-fenildiamina (OPD). Se utilizaron los sueros control negativo y positivo incluidos en el "kit". La lectura se realizó a 490 nm en un colorímetro Titertek Multiskan.

III.10.2.2. ELISA experimental

Se emplearon placas de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano (Dynatech). Estas fueron tapizadas con la cepa P-Madrid/90 purificada en gradiente de sacarosa. El virus previamente titulado, como se ha descrito en el apartado III.8.6., se diluyó en tampón carbonato-bicarbonato pH 9'6 a una concentración óptima. Se depositaron 100 μ l por pocillo de la dilución de virus. La adsorción a la placa se realizó durante 16 horas a 4°C, tras lo cual se eliminó el antígeno no fijado mediante 4 lavados con PBS-Tween.

Los sueros fueron diluidos en base 2 desde 1/16 hasta 1/2048 en el tampón correspondiente. La incubación se llevó a cabo durante 1 hora a 37°C. Tras ella, se procedió al lavado y a la posterior adición del conjugado (proteína A-peroxidasa) diluido 1/1000 en el mismo tampón.

Después de otro período igual de incubación y nuevos lavados, se añadieron 200 μ l por pocillo del sustrato

dimetilaminobenzoico-benzotiazolinona (DMAB-MBTH). Se incubó a temperatura ambiente durante 10-15 minutos hasta la aparición de color.

La reacción fue frenada con 50 μ l por pocillo de H_2SO_2 3N y la lectura se llevó a cabo a 620 nm en un colorímetro Titertek Multiskan.

III.10.3. Técnica de inmunodetección de proteínas fijadas a filtros de nitrocelulosa (ID)

Previamente se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida empleando CVC purificado como muestra, con el fin de separar sus proteínas estructurales. Posteriormente, estas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). Para ello se empleó un aparato de transferencia semiseca (Bio-Rad), en presencia del tampón correspondiente. Se aplicó una intensidad de corriente de 2'5 mA/cm durante 30 minutos.

La membrana de nitrocelulosa se dividió en tiras longitudinales para proceder a la inmunoreacción. Estas se incubaron junto con los sueros diluidos 1/30 en PBS-leche-Tween 20 (500 μ l/canal) durante 1 hora a 37°C en agitación. Tras varios lavados utilizando el mismo tampón, las tiras se incubaron en presencia del conjugado (1000 μ l/canal) durante 1 hora a 37°C en agitación. Se utilizó como conjugado proteína A-peroxidasa diluida 1/500 en el mismo tampón (1000 μ l/canal).

La reacción se reveló a los 10-15 minutos empleando como sustrato 4-cloronaftol en presencia de H_2O_2 .

III.11. EXPERIMENTACION ANIMAL

III.11.1. Animales empleados

Las pruebas de inmunización experimental se llevaron a cabo utilizando 10 perros de raza Beagle (Tohuer S.A., de Valladolid). Fueron desparasitados con oxibendazol y niclosamida a los 15, 30 y 45 días de vida. Se suspendió la lactancia materna hacia el primer mes de edad y posteriormente fueron alimentados con pienso comercial extrusionado administrado en tolva "ad libitum".

Durante la prueba, los cachorros permanecieron alojados en grupos de dos, en función del tipo de inmunización ensayada. Los animales contaban con 4 meses de edad al comienzo del estudio y se encontraban libres de anticuerpos frente al CVC.

Estos perros fueron inoculados con los productos siguientes: cepa P-Madrid/90 inactivada, glicoproteína S, proteínas N+M y vacuna inactivada comercial frente a CVC. Los dos animales restantes se conservaron como testigos de la prueba.

III.11.2. Preparación de los productos ensayados. **Adyuvantes**

III.11.2.1. Coronavirus canino (cepa P-Madrid/90)

Se empleó el aislado de campo purificado con un título aproximado de $1'84 \times 10^7$ DI₅₀CT/ml. Para la inoculación, el virus fue inactivado con beta-propiolactona (BPL) al 0'05%, siguiendo el método descrito por Stone y Hess en 1967 con una modificación. Esta consistió esencialmente en la incubación de la mezcla en agitación constante a 37°C durante 24 horas para lograr una completa hidrólisis de la BPL.

Con el fin de confirmar la completa inactivación del virus,

éste fue inoculado en cultivos celulares. La ausencia de ECP se consideró como prueba de ello.

La dosis de proteína vírica administrada por animal fue de 2 μg , equivalentes a $1 \times 10^5 \text{DI}_{50}\text{CT}$.

Como adyuvante se utilizó una mezcla de Alúmina y Quil A (Al+Quil A, Superfos). Cada producto ensayado se adsorbió en alúmina durante 30 minutos a temperatura ambiente utilizando 0'08 $\mu\text{l}/\mu\text{g}$ proteína, añadiéndose posteriormente 50 μg de Quil A por dosis.

III.11.2.2. Proteínas víricas

Para la inoculación se emplearon la glicoproteína S y las proteínas N+M. Las dosis administradas fueron de 55 y 500 μg por animal, respectivamente.

Los adyuvantes y sus dosis correspondientes fueron los mismos que para el CVC completo.

III.11.2.3. Vacuna comercial

Se empleó una vacuna frente a CVC, (lote n°: 145111A, Duramune Cv-K, Fort Dodge Laboratories, Iowa). Este producto contiene la cepa TN 449 de CVC purificada e inactivada. Cuenta en su composición con gentamicina, mertiolato y un fungicida como conservantes.

III.11.3. Protocolo experimental

La experimentación se desarrolló durante 60 días. Se administraron dos dosis de cada producto ensayado como se detalla en la tabla 2:

TABLA 2: Número de animales empleados, productos y dosis inoculados en el ensayo de inmunización.

Nº ANIMALES	PRODUCTO	DOSIS/ANIMAL
2	CVC completo (P-Madrid/90)	10^4 DI ₅₀ CT (2µg)
2	Glicoproteína S	55 µg
2	Proteínas N+M	500 µg
2	Vacuna comercial	10^3 DI ₅₀ CT
2	Testigo	-

La primera dosis de cada producto se administró el día 0 y la segunda el día 15 de la prueba.

La inoculación se practicó siempre por vía subcutánea en la región costal.

A lo largo del estudio, los animales fueron sometidos a distintos controles: observación clínica diaria, toma de temperatura, análisis coprológico, recuento celular sanguíneo y determinación de anticuerpos específicos.

El análisis de heces para la detección de formas parasitarias se llevó a cabo siguiendo el método de sedimentación de Telemann. Este tipo de analítica se llevó a cabo los días 0, 30 y 60 de la experiencia.

Los parámetros sanguíneos evaluados fueron: hematíes y leucocitos totales, hematocrito, hemoglobina (total, valor medio y valor medio corpuscular), volumen corpuscular medio y plaquetas. Se empleó para ello un contador celular automático (Sysmex F-100) con diluidor (Sysmex DD-100). Estos parámetros

fueron determinados al comienzo de la experiencia y en tres ocasiones más durante el curso de la misma (días 0, 8, 25 y 53).

Se realizaron extracciones de sangre los días 0, 8, 12, 15, 20, 25, 29, 32, 39, 43, 50, 53, 56, y 60 del experimento, con el fin de seguir la evolución del título de anticuerpos específicos durante la prueba.

III.11.4. Contraprueba

Para la contraprueba se utilizó la cepa P-Madrid/90 virulenta y de bajo número de pase, con un título de $3'8 \times 10^7$ $DI_{50}CT/ml$.

En el día 46 del ensayo, se administró oralmente a cada animal 1 ml de inóculo conteniendo una dosis de virus aproximada de 1×10^5 $DI_{50}CT$.

Los animales fueron controlados como se describe en el apartado anterior, a excepción de la toma de muestras fecales. La recolección de heces (con hisopos rectales) se llevó a cabo diariamente, para el seguimiento de la eliminación de virus, desde el día 47 hasta el día 60 de la prueba. Se conservaron sumergidos en 2 ml de medio L-15 a 4°C hasta su utilización.

Para el aislamiento de virus se procedió como se ha descrito en el apartado III.8.1.

La presencia de partículas víricas se confirmó mediante ME e IME, realizadas a partir de los sobrenadantes de los cultivos inoculados.

III.12. METODOS ESTADISTICOS

Se empleó el programa Episcopa para realizar los cálculos correspondientes a la evaluación de las técnicas y grado de acuerdo entre las mismas. Este sistema fue desarrollado por Frankena, K. y Goelema, J.O. (Dpto. de Producción Animal de Wageningen, Holanda).

III.12.1. Evaluación de las técnicas de diagnóstico. Sensibilidad y especificidad

Cuando se desarrolla o pone a punto una técnica de diagnóstico es necesario valorar su **validez** o capacidad para distinguir entre animales enfermos y no enfermos. La validez se expresa mediante la sensibilidad y la especificidad. Para la evaluación de este parámetro debe disponerse de un segundo método diagnóstico con una validez del 100% aproximadamente. Se emplea para ello un tabla de contingencia 2x2, a partir de la cual pueden calcularse otros parámetros como:

* Valor predictivo de un resultado positivo ó negativo, ej: el porcentaje de animales positivos/negativos que realmente son positivos/negativos.

* Prevalencia aparente, ej: El número de animales positivos dividido entre el número total de animales analizados.

RESULTADOS	ESTADO DE SALUD		TOTAL
	ENFERMOS	NO ENFERMOS	
POSITIVOS	A	B	A + B
NEGATIVOS	C	D	C + D
TOTAL	A + C	B + D	N

A = número de verdaderos positivos

B = número de falsos positivos

C = número de falsos negativos

D = número de verdaderos negativos

$$* \text{ Sensibilidad (\%) } = 100 \times \mathbf{A}/(\mathbf{A}+\mathbf{C})$$

$$* \text{ Especificidad (\%) } = 100 \times \mathbf{D}/(\mathbf{B}+\mathbf{D})$$

Así, la **sensibilidad** es la capacidad de la técnica para detectar animales enfermos, y se define como la proporción de animales enfermos que resultaron positivos a la prueba.

La **especificidad** es la capacidad de la técnica para detectar animales no enfermos, y se define como la proporción de animales no enfermos que resultaron negativos a la prueba.

$$* \text{ Valor predictivo (val. posit., \%) } = 100 \times \mathbf{A}/(\mathbf{A}+\mathbf{B})$$

$$* \text{ Valor predictivo (val. negat., \%) } = 100 \times \mathbf{D}/(\mathbf{D}+\mathbf{C})$$

$$* \text{ Verdadera prevalencia (\%) } = 100 \times (\mathbf{A}+\mathbf{C})/\mathbf{N}$$

$$* \text{ Prevalencia aparente (\%) } = 100 \times (\mathbf{A}+\mathbf{B})/\mathbf{N}$$

III.12.2. Grado de acuerdo entre las técnicas empleadas

Cuando se utilizan diferentes métodos para el diagnóstico de una enfermedad, resulta interesante conocer el **grado de acuerdo** entre los mismos.

Es conveniente valorar el grado de concordancia existente entre una técnica de referencia y el método objeto de estudio. Ello puede llevarse acabo a partir de los datos obtenidos mediante las dos técnicas sobre una misma muestra de población. El grado de acuerdo entre ambas pruebas diagnósticas se expresa con el valor de kappa (**k**). Este valor expresa el grado de acuerdo más allá del azar.

Un k igual a 0 indica la no existencia de acuerdo entre las técnicas, mientras que un k igual a 1 expresa un perfecto acuerdo entre ellas. Hay que tener en cuenta que k indica cual es el método que da mejor resultado en cuanto al número correcto de animales enfermos o sanos. Este valor puede obtenerse mediante un tabla de contingencia 2x2:

		TECNICA DE REFERENCIA		
TECNICA ESTUDIADA		POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
POSITIVOS	A	B	A + B	
NEGATIVOS	C	D	C + D	
TOTAL	A + C	B + D	N	

$A + D$ = número de resultados que coinciden

$B + C$ = número de resultados que no coinciden

La proporción esperada de resultados que coinciden (PE) es:

$$PE = (A+B)/N \times (A+C)/N + (C+D)/N \times (B+D)/N$$

La proporción máxima de acuerdo no debida al azar es 1-PE. La proporción observada de resultados que coinciden más allá del azar es: $(A+D)/N - PE$

El valor kappa se define como: $(A+D)/(N-PE) / (1-PE)$

En palabras, k es el cociente entre la proporción observada de acuerdo más allá del azar y la máxima proporción de acuerdo más allá del azar. Un k de 0'5 indica un moderado nivel de acuerdo entre las técnicas.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1. RESULTADOS DEL AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DEL CORONAVIRUS CANINO (CVC)

IV.1.1. Aislamiento en cultivos celulares

Se obtuvieron resultados positivos únicamente a partir de las muestras de heces procedentes de una población cerrada (criadero "P").

Para el aislamiento se procesaron dos de las muestras en las que previamente se había detectado mediante microscopía electrónica (ME) la presencia de posibles partículas de coronavirus. El efecto citopático (ECP) en los cultivos inoculados se desarrolló hacia las 72 hpi después del segundo pase ciego sobre células A-72.

Paralelamente, en el caso de la infección testigo con la cepa de referencia s3786/6, el ECP apareció de forma más temprana, aproximadamente hacia las 48 hpi.

El ECP fue semejante en ambos casos y se caracterizó por la aparición de células vacuolizadas y redondeadas, que finalmente acabaron desprendiéndose de la superficie del frasco (Fotografías 1 y 2).

IV.1.2. Microscopía electrónica (ME)

IV.1.2.1. Tinción negativa

Mediante ME únicamente se detectó la presencia de partículas en muestras fecales procedentes de animales jóvenes. La media de edades osciló entre los 2 y 3 meses. Estos cachorros generalmente se encontraban en fase de recuperación de procesos patológicos de tipo gastroentérico.

La morfología de las partículas víricas visualizadas durante la prospección rutinaria de heces patológicas resultó poco definida. Ello posiblemente fue debido al deterioro de sus estructuras motivado por el almacenaje de las muestras (Fotografía 3).

La presencia de coronavirus se detectó en 4 ocasiones (5'3%). En dos de ellas pudo observarse una infección mixta por parvovirus (Fotografía 4). Estas últimas muestras no fueron procesadas para el aislamiento, ya que la línea celular utilizada (A-72) permite además la replicación de parvovirus.

Para la confirmación de la infección sobre monocapas inoculadas, se utilizaron nuevamente técnicas de ME. Se realizó tinción negativa a partir de los sobrenadantes de los cultivos celulares con ECP.

Las partículas víricas visualizadas en este caso tuvieron una morfología mucho más definida y característica de coronavirus que las observadas en preparaciones directas a partir de heces (Fotografía 5). Entre ellas pudo apreciarse un moderado pleomorfismo con predominio de las partículas redondeadas, siendo su diámetro medio de 105 nm. Sobre la superficie de las mismas se visualizaron peplómeros de unos 20 nm de longitud. La presencia de proyecciones dispuestas en forma de corona caracteriza a todos los miembros de la familia.

La inmunomicroscopía electrónica (IME) permitió la identificación del virus. El tratamiento con suero hiperinmune anti-CVC indujo la formación de inmunocomplejos constituidos por grandes masas de partículas víricas unidas entre sí por puentes de anticuerpos. Así, el contorno de los virus perdió definición y sólo pudo observarse nítidamente la corona característica de los miembros de esta familia en los márgenes de los inmunocompejos (Fotografía 6).

IV.1.2.2. Cortes ultramicroscópicos

Otra prueba más para la confirmación del aislamiento de virus y de su ciclo de replicación, se obtuvo realizando cortes ultrafinos a partir de los cultivos celulares infectados. Las monocapas se recogieron seriadamente a las 14, 24 y 48 hpi para su observación mediante ME.

Durante el estadio temprano de la infección (14 hpi) se detectó la presencia de viriones en pequeños grupos localizados en la luz del retículo endoplásmico rugoso (RER) y aparato de Golgi. Morfológicamente, se caracterizaron por poseer una zona central electrolúcida y una nucleocápsida electrodensa granular o tubular asociada a la superficie interna de la envuelta vírica (Fotografía 7).

En fases más tardías (24 hpi), los viriones se visualizaron en mayor número, agrupados e incluidos en vesículas mayores. En este caso las partículas fueron casi uniformemente electrodensas (Fotografía 8).

No se observaron procesos de gemación en ninguna de las estructuras visualizadas. Las partículas se caracterizaron por su forma redondeada, moderado pleomorfismo y diámetro variable entre 60 y 100 nm.

Por último, alrededor de las 48 hpi pudieron observarse grandes masas de viriones en el espacio extracelular (Fotografía 9).

IV.1.3. Adaptación del virus aislado (cepa P-Madrid/90) a la línea celular. Títulos obtenidos

No existió dificultad alguna en la adaptación del virus a la línea celular empleada, aunque durante el proceso pudieron observarse algunas variaciones en cuanto a los tiempos de infección, desarrollo de ECP y títulos obtenidos.

El ECP pudo visualizarse con claridad a partir del segundo pase ciego y se incrementó en intensidad durante pases sucesivos. Paralelamente, los tiempos de infección fueron acortándose.

Se consideró finalizado el período de adaptación del virus hacia el cuarto pase "in vitro", ya que a partir de este punto se normalizaron los tiempos de infección y la aparición del ECP. De forma usual, el ECP alcanzó el 30-40% hacia las 24 hpi, llegando al 80-90% hacia las 48 hpi.

El cálculo de las dosis infectivas 50 en cultivo de tejidos se llevó a cabo en placa de 96 pocillos. Entre el primero y el sexto pase del aislado los títulos oscilaron entre 10^5 DI₅₀CT/ml (inicial) y 10^9 DI₅₀CT/ml (final).

IV.1.4. Obtención de inóculos. Títulos alcanzados

Con el fin de normalizar la técnica para la obtención de inóculos víricos, se realizaron una serie de pruebas previas aplicando diferentes tiempos y dosis de infección.

Se ensayaron multiplicidades de infección (m.i.) entre 0 y 1 DI₅₀CT/célula y tiempos de adsorción entre 1 y 2 horas, empleando para la infección monocapas de 24, 48 y 72 horas. Los inóculos se recogieron a las 24, 48 y 72 hpi.

En función de los resultados obtenidos, se establecieron las condiciones óptimas de infección. Así, se emplearon rutinariamente tapices celulares de 24 horas postsubcultivo, y períodos de adsorción de 1'5 horas.

Cuando el inóculo era destinado a la producción de virus, se empleaba una m.i. de 0'5 DI₅₀CT/célula y la recolección se llevaba a cabo a las 24 hpi (aproximadamente con un ECP del 20-30 %).

En los casos en los que la producción de inóculo tuvo como fin la obtención de virus purificado, la m.i. elegida fue de 10 DI₅₀CT/célula y la recolección se realizó a las 48 hpi (aproximadamente con un ECP del 80-90%).

En general, con períodos cortos de infección la cantidad de virus intracelular es mayor, mientras que a medida que se prolonga el tiempo de infección se va incrementando la proporción de partículas víricas extracelulares.

Los títulos correspondientes a los distintos inóculos obtenidos oscilaron entre 10⁶ y 10⁹ DI₅₀CT/célula, respectivamente.

IV.1.5. Purificación de virus. Títulos obtenidos

Tras el proceso de purificación (Brian y col., 1980), el virus completo se situó en la zona del gradiente correspondiente al 46% de sacarosa (densidad equivalente a 1,20 g/cc).

En algunas ocasiones apareció además una pequeña banda en una zona ligeramente superior a la anterior.

Mediante ME se comprobó la composición de cada una de estas fracciones. En el primer caso se observó la presencia de partículas víricas completas, con un adecuado grado de concentración y pureza. En el segundo caso, la banda estuvo constituida mayoritariamente por partículas que habían perdido todas o gran parte de sus proyecciones de superficie. La pérdida de integridad se manifestó además por la penetración del ácido fosfotúngstico al interior de la bicapa lipídica.

Los títulos obtenidos mediante ELISA correspondientes al virus purificado oscilaron entre 1/100 y 1/1600.

IV.1.6. Estudio de las proteínas víricas estructurales mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Con el fin de caracterizar las proteínas estructurales del CVC aislado (cepa P-Madrid/90), se llevó a cabo el análisis de las mismas mediante SDS-PAGE (geles de acrilamida-bisacrilamida). Para ello se emplearon virus purificados en gradiente de sacarosa (cepa aislada y de referencia s3786/6). También se incluyeron muestras de células A-72 infectadas con la cepa de campo y sin infectar. Los pesos moleculares de las distintas proteínas se calcularon por comparación con un patrón o marcador comercial (Fotografía 10).

Los resultados obtenidos permitieron constatar la identidad de ambas cepas de virus en cuanto a sus patrones de movilidad electroforética.

Según estos resultados, los pesos moleculares de las proteínas mayoritarias S, N y M no difieren de aquellos ya descritos para CVC: 204, 50, y 32 kD, respectivamente (Garwes y Reynolds, 1981). Sin embargo, en los geles analizados no se observó la presencia de la glicoproteína mayoritaria de 22 kD que describen los mencionados autores. Según nuestros resultados, en el caso de que este componente existiera, sería de carácter minoritario. Para realizar una determinación más exacta, sería conveniente realizar otro tipo de análisis con el virus marcado radiactivamente.

IV.1.7. Identificación de la cepa de campo mediante inmunodetección de proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa (ID)

Se realizaron diversos ensayos previos para la puesta a punto de la técnica, como se describirá más adelante en el apartado IV.2.1.2. Una vez establecidas las condiciones óptimas del procedimiento, se empleó la ID para confirmar la identidad

del aislado de campo (Fotografía 11).

La comparación se llevó a cabo utilizando la cepa s3786/6 de CVC y suero hiperinmune de referencia. El patrón de respuesta serológica específica frente a las distintas proteínas estructurales resultó indiferenciable en ambos casos

Ninguno de los sueros analizados mostró reacción alguna frente a la glicoproteína estructural de 22 kD que describen Garwes y Reynolds (1981).

IV.2. RESULTADOS DE LOS METODOS SEROLOGICOS

IV.2.1. Puesta a punto de las técnicas

IV.2.1.1. Puesta a punto del ELISA experimental

Se eligió un tampón carbonato-bicarbonato pH 9'6 para diluir el virus purificado, ya que la fijación del antígeno a la placa se ve favorecida en pH básico.

Para determinar las concentraciones óptimas de antígeno y conjugado se realizó una titulación previa. Las placas se tapizaron con diferentes concentraciones de antígeno, haciendo diluciones en base dos desde 1/50 hasta 1/1600.

Estos ensayos se llevaron a cabo utilizando sueros conocidos (hiperinmune, positivo débil y negativo). Los resultados se muestran en la figura 1. Se obtuvieron valores semejantes de absorbancia con las 4 primeras diluciones. La regresión de la curva se observó a partir de la dilución 1/400. En función de esta cinética se consideró la concentración de 0'6 $\mu\text{g/pocillo}$ como óptima para el tapizado de las placas.

Asimismo, se realizó una titulación del conjugado (proteína A-peroxidasa) empleando diluciones en base dos desde 1/500 hasta

1/8000. Finalmente, se eligió la dilución 1/1000 como la más adecuada para los ensayos (Fig. 2). Ambas lecturas se realizaron a 620 nm.

De esta forma se normalizaron las condiciones de la técnica, combinándose mínimo color de fondo y máximas sensibilidad y especificidad.

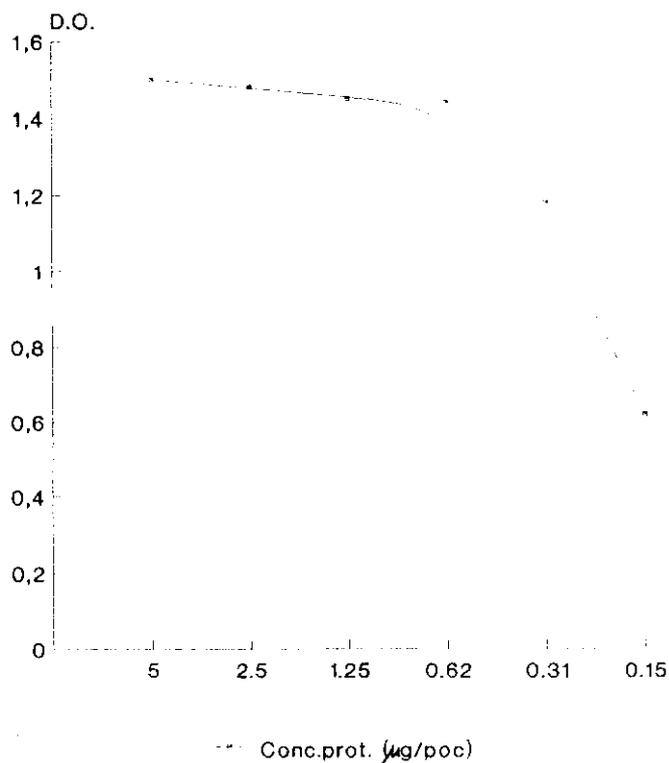


Fig. 1.- Determinación de la concentración óptima de antígeno (cepa P-Madrid/90) para la puesta a punto del ELISA experimental. Lectura a 620 nm.

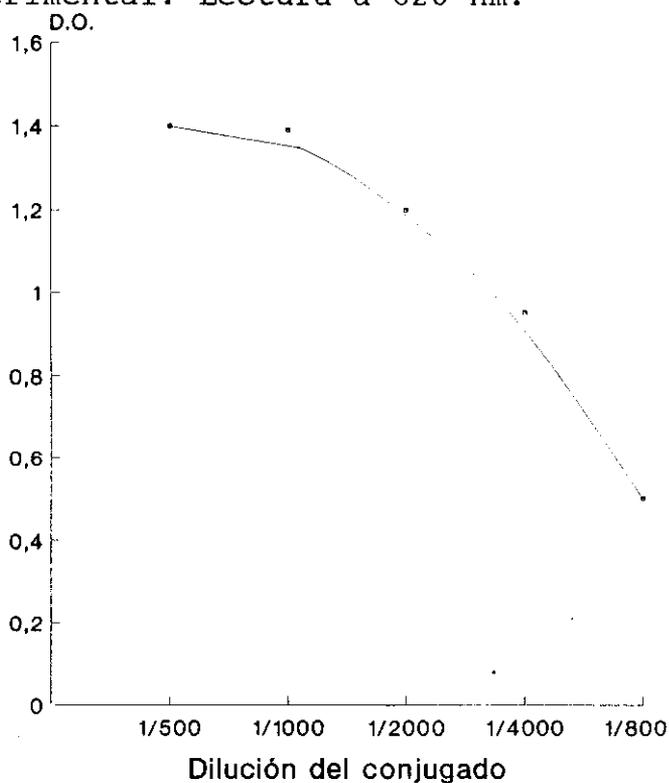


Fig. 2.- Determinación de la dilución óptima de conjugado (proteína A-peroxidasa) para la puesta a punto del ELISA experimental. Lectura a 620 nm.

IV.2.1.2. Puesta a punto de la técnica de inmunodetección de proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa (ID)

Se realizaron diversos ensayos previos de electroforesis y posterior transferencia a membranas de nitrocelulosa utilizando CVC semipurificado y purificado. Con el primero de ellos pudo observarse la aparición de bandas inespecíficas en los filtros tras la inmunoreacción, por lo que en adelante se utilizó virus purificado.

La electroforesis se llevó a cabo utilizando dos tamaños de soporte para geles como se describe en el apartado III.9.3.1. En función de la menor cantidad de virus necesario y la facilidad de manejo fueron empleados minigeles de forma rutinaria.

En cuanto a la transferencia, se utilizó la de tipo semiseco por la obtención de mejores resultados y mayor rapidez de ejecución que la húmeda o convencional.

IV.2.2. Resultados obtenidos a partir de los sueros experimentales

Estos resultados son los correspondientes a los sueros obtenidos a partir de la toma previa de sangre y de las siguientes 13 sangrías realizadas con los 10 animales de experimentación a lo largo del ensayo. Estos sueros (140 en total) son considerados en este apartado como muestras individuales, a fin de poder emplear sus resultados en la determinación de la sensibilidad y especificidad de la técnica ELISA ensayada. Por ello, en estos diagramas y gráficas no se hace alusión a los productos inoculados en cada caso.

IV.2.2.1. Seroneutralización

Los resultados obtenidos mediante esta técnica se reflejan en la figura 3. Se han desglosado en distintas categorías en función del título obtenido. Se consideraron negativos los sueros con un título menor de 1/16.

IV.2.2.2. ELISA experimental

Los resultados obtenidos mediante la aplicación del ELISA desarrollado por nosotros a los sueros procedentes de los animales de experimentación, se muestran en la figura 4.

En la gráfica, cada símbolo representa el valor de un suero individual. Se consideraron positivos todos aquellos sueros con valores de absorbancia mayores de 0'5. La lectura se realizó a 620 nm.

IV.2.2.3. Sensibilidad y especificidad

Se consideró la seroneutralización como técnica de referencia con el fin de determinar estos parámetros para el enzimoimmunoensayo desarrollado por nosotros. Los resultados obtenidos correspondientes a los 140 sueros experimentales empleando ambas técnicas se muestran en la tabla 3:

TABLA 3. - Resultados correspondientes a los sueros experimentales obtenidos mediante la técnica de referencia (seroneutralización) y el ELISA desarrollado por nosotros.

ELISA EXPERIMENTAL	SERONEUTRALIZACION		
	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
POSITIVOS	72	5	77
NEGATIVOS	18	45	63
TOTAL	90	50	140

Según estos datos, se hallaron los parámetros en relación con el ELISA experimental que aparecen en la tabla 4:

TABLA 4.- Porcentajes de sensibilidad, especificidad y valores predictivos para los resultados positivos y negativos, correspondientes al método ELISA desarrollado por nosotros.

PARAMETRO	VALOR	INTERVALOS DE CONFIANZA	
		LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
Sensibilidad (%)	80'00	71'74	88'26
Especificidad (%)	90'00	81'68	98'32
Valores predictivos+ (%)	93'51	88'00	99'01
Valores predictivos- (%)	71'43	60'27	82'58

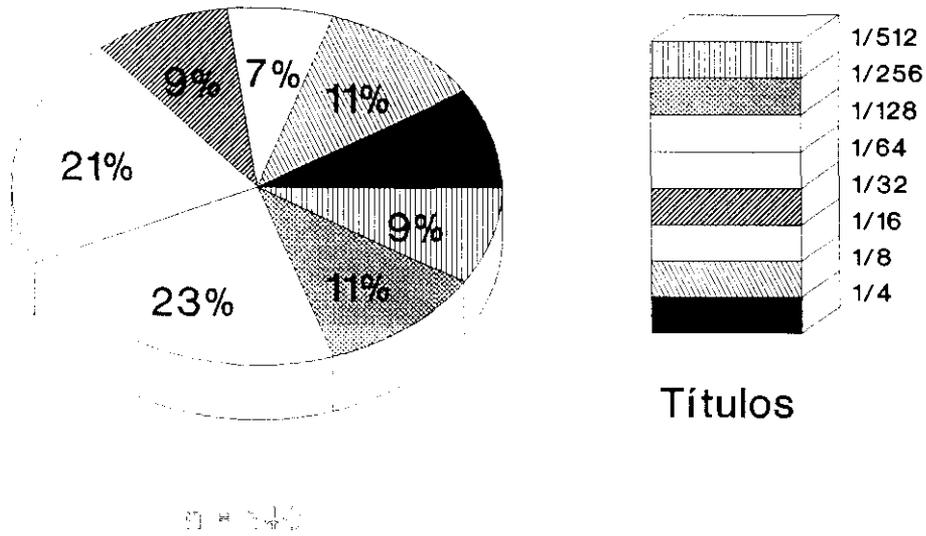


Fig. 3.- Diagrama de sectores: distribución de títulos obtenidos mediante seroneutralización a partir de los sueros experimentales.

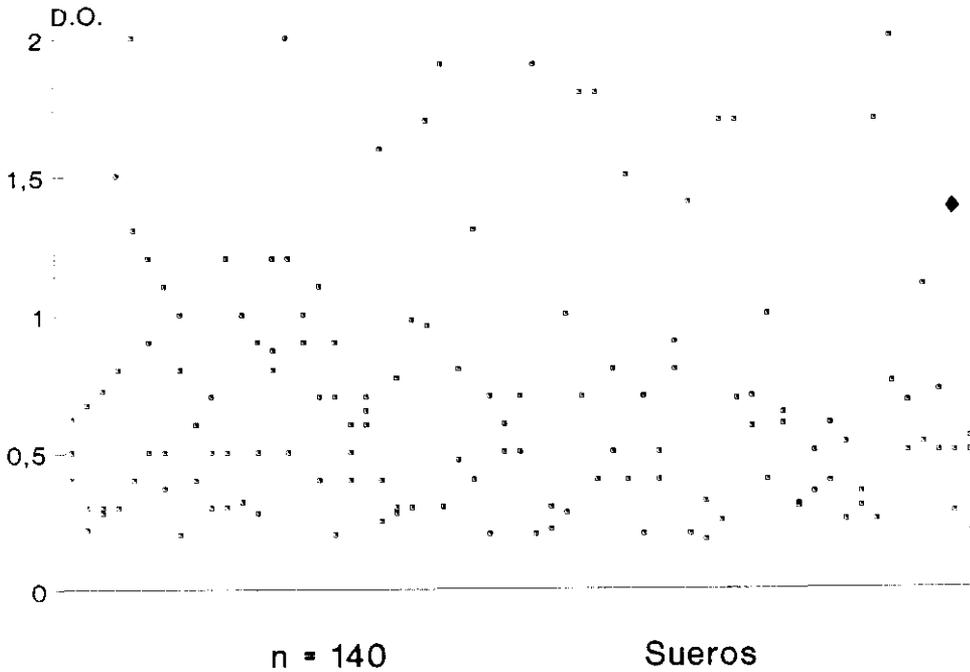


Fig. 4.- Distribución de los valores obtenidos mediante el ELISA experimental a partir de los sueros experimentales. Los símbolos \blacklozenge y \lozenge se corresponden con los valores de los sueros de referencia positivo y negativo, respectivamente. Lectura a 620 nm.

IV.2.3. Resultados obtenidos a partir de los sueros de campo

IV.2.3.1. Comparación de las dos técnicas ELISA

Para llevar a cabo esta comparación se emplearon como control positivo y negativo unas mezclas de sueros de campo previamente valorados y con cifras de absorbancia en ELISA marcadamente alta y baja, respectivamente. Estas mezclas fueron analizadas mediante las dos técnicas ELISA, empleando diluciones en base dos de los sueros desde 1/8 hasta 1/4096.

Los valores medios de absorbancia obtenidos aparecen en la figura 5.

Los resultados referentes al control positivo revelan una mayor sensibilidad del ELISA comercial frente al experimental. Observando los datos obtenidos con la mezcla de sueros negativos, puede apreciarse que la especificidad del ELISA desarrollado por nosotros es marcadamente superior, al aparecer un notable fondo inespecífico en las diluciones menores de 1/128 con la técnica comercial.

Una vez comparadas la sensibilidad y especificidad del enzoinmunoensayo puesto a punto (experimental) con las del comercial, se procedió al cálculo del grado de concordancia existente entre las dos pruebas. Ambas técnicas se aplicaron a los 26 sueros procedentes de las hembras reproductoras del criadero "P" (población cerrada) y a los 25 del Centro de Protección Animal de Cantoblanco (población abierta).

La especificidad de los resultados se verificó mediante la técnica de inmunodetección de proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa.

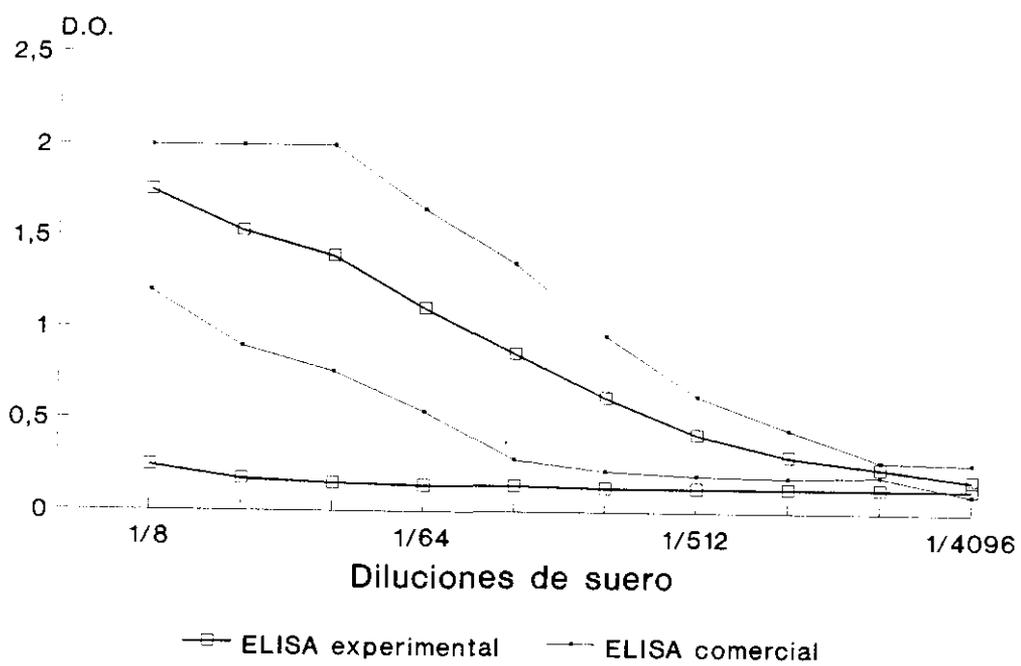


Fig. 5.- Comparación de los valores obtenidos mediante las dos técnicas inmunoenzimáticas (experimental y comercial) empleando una mezcla de sueros positivos y otra de sueros negativos.

IV.2.3.2. ELISA experimental

Los resultados obtenidos mediante la aplicación de este método a los sueros de campo se muestran en la figura 6a. Los sueros pertenecientes a cada población aparecen marcados en la gráfica con símbolos diferentes. Cada símbolo representa el valor de un suero individual. Se consideraron positivos aquellos sueros con valores de absorbancia mayores de 0.5. La lectura se realizó a 620 nm.

IV.2.3.3. ELISA comercial

Los resultados se muestran en la figura 6b. El origen de los sueros de campo se indica de igual forma que en la figura 6a. Cada símbolo representa el valor de un suero individual. Se consideraron positivos los sueros con valores de absorbancia mayores de 0.5. La lectura se realizó a 490 nm.

IV.2.3.4. Concordancia entre pruebas: ELISA experimental y comercial

Para establecer el grado de acuerdo entre las técnicas comparadas, se elaboró una tabla de contingencia tomando como referencia el enzimoimmunoensayo comercial. Los resultados se muestran en la tabla 5:

TABLA 5.- Resultados correspondientes a los sueros de campo obtenidos mediante las dos técnicas inmunoenzimáticas.

ELISA EXPERIMENTAL	ELISA COMERCIAL		
	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
POSITIVOS	18	3	21
NEGATIVOS	6	24	30
TOTAL	24	27	51

A partir de estos resultados obtenemos los siguientes parámetros en relación con la concordancia existente entre las dos técnicas de diagnóstico:

* Proporción de acuerdo observada:	0'82
* Proporción de acuerdo observada:	0'51
* Acuerdo observado menos el debido al azar:	0'32
* Máximo acuerdo posible más allá del azar:	0'49
* Valor kappa (k):	0'64

El valor **kappa** expresa el grado de acuerdo más allá del azar entre las pruebas analizadas. Los valores límite para este parámetro son 0 (ningún acuerdo) y 1 (perfecto acuerdo), correspondiendo a 0'5 un nivel moderado de acuerdo.

Así, un **k** igual a 0'64, como es este caso, indica una buena correlación o grado de acuerdo entre ambas técnicas.

Estos resultados desglosados en función de la población origen de los sueros se muestran en la figura 7.

Mediante el empleo del ELISA comercial, el porcentaje de animales seropositivos fue de un 54% en la población cerrada y de un 40% en la abierta. Con el ELISA experimental, se detecta la misma proporción de seropositivos en el criadero que con el método comercial, pero el porcentaje en el Centro de Protección Animal de Cantoblanco fue menor (32%). En la gráfica se aprecia de una forma ostensible la detección de un mayor número de animales seropositivos en poblaciones cerradas con ambas técnicas.

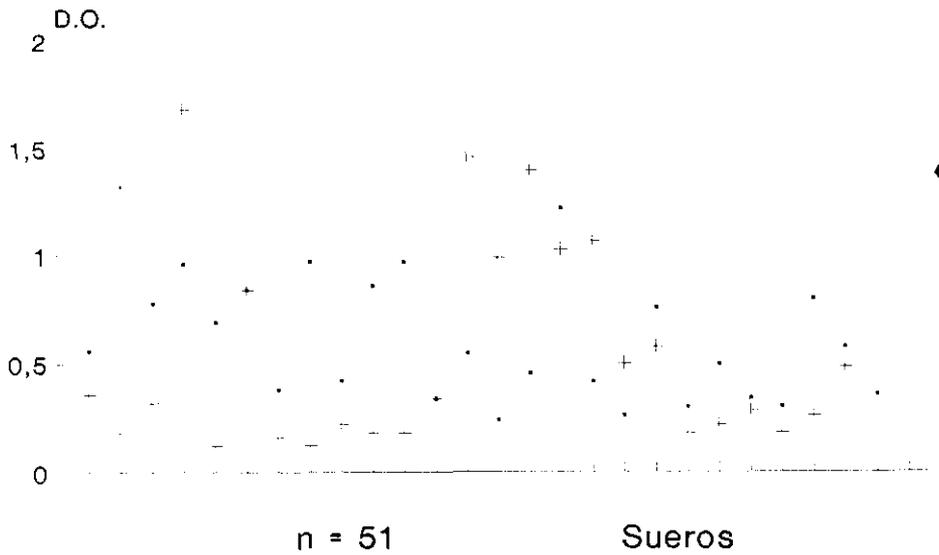


Fig. 6a

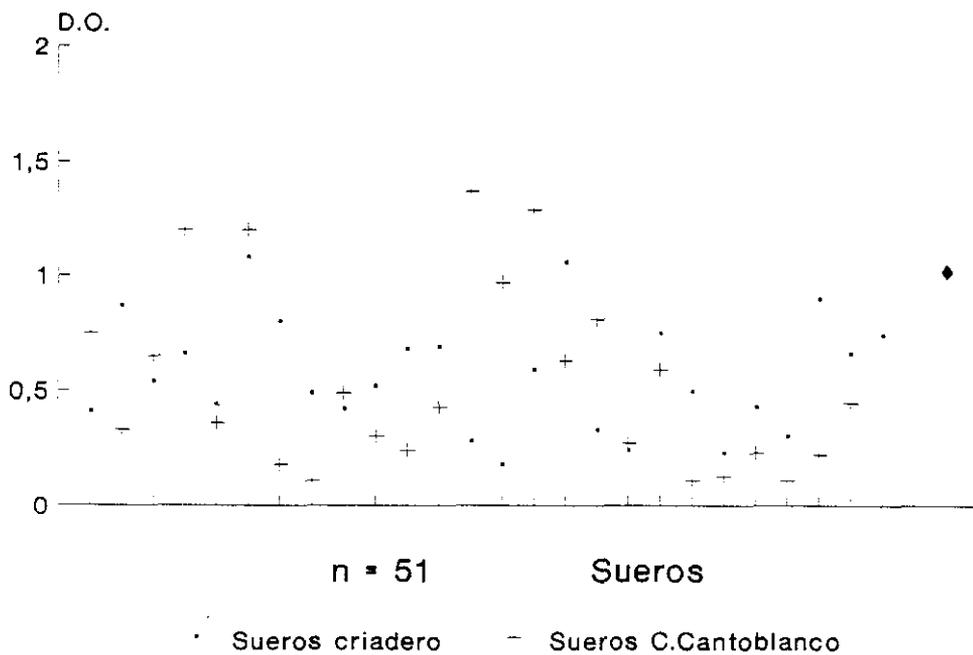


Fig. 6b

Fig. 6.- Distribución de los valores obtenidos mediante el ELISA experimental (6a) y comercial (6b) a partir de los sueros de campo con diferenciación de su origen: población abierta (C.Cantoblanco) y población cerrada (criadero). Los símbolos \blacklozenge y \diamond se corresponden con los valores de los sueros de referencia positivo y negativo, respectivamente. Lectura a 620 nm (Fig. 6a) y a 490 nm (Fig. 6b).

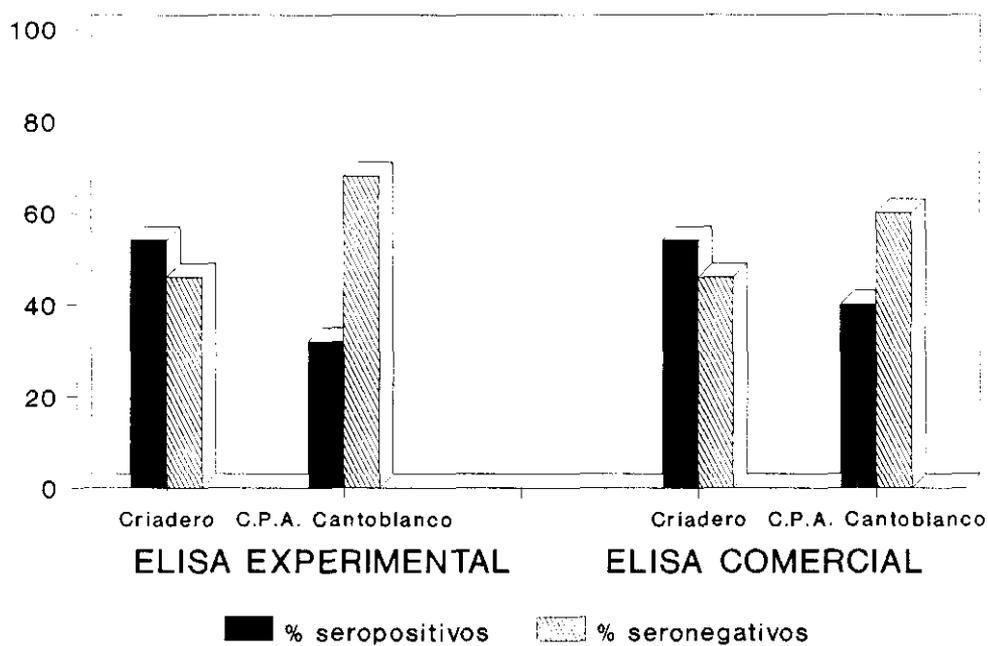


Fig. 7.- Porcentajes de seropositividad en las dos poblaciones caninas (cerrada y abierta) obtenidos mediante las dos técnicas inmunoenzimáticas.

IV.2.3.5. Inmunodetección de proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa (ID)

Esta técnica se utilizó para confirmar la especificidad de reacción de los sueros de campo frente a las distintas proteínas estructurales del CVC aislado. Fue aplicada al 75% de los sueros, muestra que se consideró significativa para esta comprobación. Los resultados obtenidos con algunos de estos sueros se reflejan en la fotografía 12.

IV.2.3.6. Comparación de resultados sobre una muestra de sueros discrepantes

Como prueba discriminadora, se aplicó la técnica de inmunodetección de proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa a una muestra de sueros discrepantes. Estos se escogieron con base en los resultados opuestos obtenidos mediante las dos técnicas ELISA empleadas. Los resultados correspondientes a estos sueros se muestran en la tabla 6:

TABLA 6.- Resultados obtenidos mediante la técnica de ID correspondientes a los sueros de campo con resultados opuestos obtenidos mediante las dos técnicas ELISA.

SUERO	ID	ELISA EXPERIMENTAL	ELISA COMERCIAL
1	+	+	-
2	+	+	-
3	-	-	+
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	-	+
8	+	-	+
9	-	-	+

Como puede observarse, el número de sueros que coinciden en resultado mediante el ELISA comercial y la ID (2) es comparativamente muy inferior al número de ellos que coinciden mediante el ELISA experimental y la ID (7).

Estos resultados indicarían una mayor especificidad del ELISA experimental frente a la técnica comercial.

IV.3. RESULTADOS DE LA EXPERIMENTACION ANIMAL

IV.3.1. Análisis y preparación de los productos ensayados

IV.3.1.1. Análisis de las proteínas víricas estructurales mediante SDS-PAGE, tras la solubilización con Tritón X-114

Con el fin de verificar el fraccionamiento del CVC completo tras el proceso de solubilización con Tritón X-114, se llevó a cabo el análisis mediante SDS-PAGE (geles de acrilamida-DATD) de las fases obtenidas. Para ello se empleó CVC purificado en gradiente de sacarosa (cepa P-Madrid/90) y las fracciones acuosa y detergente obtenidas a partir de la solubilización (Fotografía 13).

Los resultados obtenidos permitieron constatar la separación de las proteínas víricas estructurales según su naturaleza hidrofílica (glicoproteína S, en la fase acuosa) o anfifílica (proteínas N y M, en la fracción detergente). Así, desde el punto de vista colorimétrico, pudo verificarse la obtención de estos componentes con un adecuado grado de pureza para su inoculación.

IV.3.1.2. Resultados de la densitometría: pureza, proporciones relativas y rendimiento de obtención de las proteínas estructurales

Mediante la densitometría llevada a cabo sobre los geles anteriormente mencionados, nos fue posible conocer el área de las curvas correspondientes a las distintas proteínas estructurales del CVC. El valor de estas superficies da como resultado el porcentaje de cada una de estas proteínas que existe en la muestra.

* CVC completo (Fig. 8)

Se depositaron 15 μ l de CVC purificado en el pocillo, correspondientes a 37'5 μ g de proteína total según el análisis realizado por el método de Lowry.

1 - **Glicoproteína S:**

Los valores de abscisas de esta curva se encuentran entre 108.9 y 111.0. Por tanto, su área expresada en porcentaje se calcula mediante el sumatorio de los valores de las áreas correspondientes a ambos puntos: (7'3 + 0'7 = 8). Así, la glicoproteína S representa un 8% en el total de proteína de la muestra analizada. Como en este pocillo tenemos 37'5 μ g de proteína total, la cantidad correspondiente a la glicoproteína S será de 3 μ g.

2 - **Proteína N:**

Los valores de abscisas de esta curva se encuentran entre 142.7 y 144.3. Por tanto, el porcentaje de esta proteína es de un 33'5% (2'3 + 31'2) en el total de proteína. Así, la cantidad de proteína N de la muestra será de 12'56 μ g.

3 - **Glicoproteína M:**

Sus valores de abscisas están entre 154.4 y 160.8. El porcentaje de glicoproteína M respecto del total será de un 17'9% (0'5 + 2'9 + 14'5). Su cantidad en la muestra analizada se corresponderá, por tanto, con 6'71 μ g.

Si en la muestra analizada contamos con un 8%, un 33'5%, y un 17'9% de las proteínas S, N y M, respectivamente, el porcentaje de pureza del CVC en este caso es del 54'9% (8 + 33'5 + 17'9). La proporción relativa de las distintas proteínas sería de 1 : 4'2 : 2'2, en el mismo orden.

* Fase acuosa (Fig. 9.)

Se depositaron 75 μ l de muestra en el pocillo, correspondientes a 10'5 μ g de proteína según el análisis realizado por el método de Lowry. El valor de abscisa correspondiente a la curva de la glicoproteína S es de 108.8. Así, el porcentaje de pureza de la misma en la fase acuosa es del 44'6% y su cantidad en la muestra analizada será de 4'68 μ g.

* Fase detergente (Fig. 10.)

Los valores de abscisa correspondientes a la curva de la proteína N están entre 140.6 y 144.4. Por tanto, el porcentaje de pureza de esta proteína en la fase detergente es del 61'7% (0'8 + 60'9).

Los puntos de abscisa de la curva de la glicoproteína M se localizan entre 158.8 y 161.0. Así, el porcentaje de pureza de esta proteína en la fase detergente será del 29% (3'7 + 25'3).

Conociendo la proporción relativa entre las distintas proteínas estructurales del CVC, podemos calcular la cantidad de las que se encuentran en la fase detergente. La cantidad de proteínas N y M en la muestra analizada es de 19'7 μ g ($4'68 \times 4'2$) y 10'3 μ g ($4'68 \times 2'2$), respectivamente.

En el proceso de solubilización con Tritón X-114 partimos de 50 μ l de CVC purificado (125 μ g) y obtenemos 150 μ l de fase acuosa (9'36 μ g de glicoproteína S) y otros 150 μ l de fase detergente (39'4 μ g de proteína N y 20'6 μ g de glicoproteína M). Conociendo la cantidad de cada proteína que existía en la muestra de CVC de partida y la cantidad de cada una de ellas que tenemos en cada fase después de la solubilización, podemos calcular los rendimientos de obtención de los distintos componentes. Estos valores equivalen al 93'6%, 94'1% y al 92'1% para las proteínas S, N y M, respectivamente.

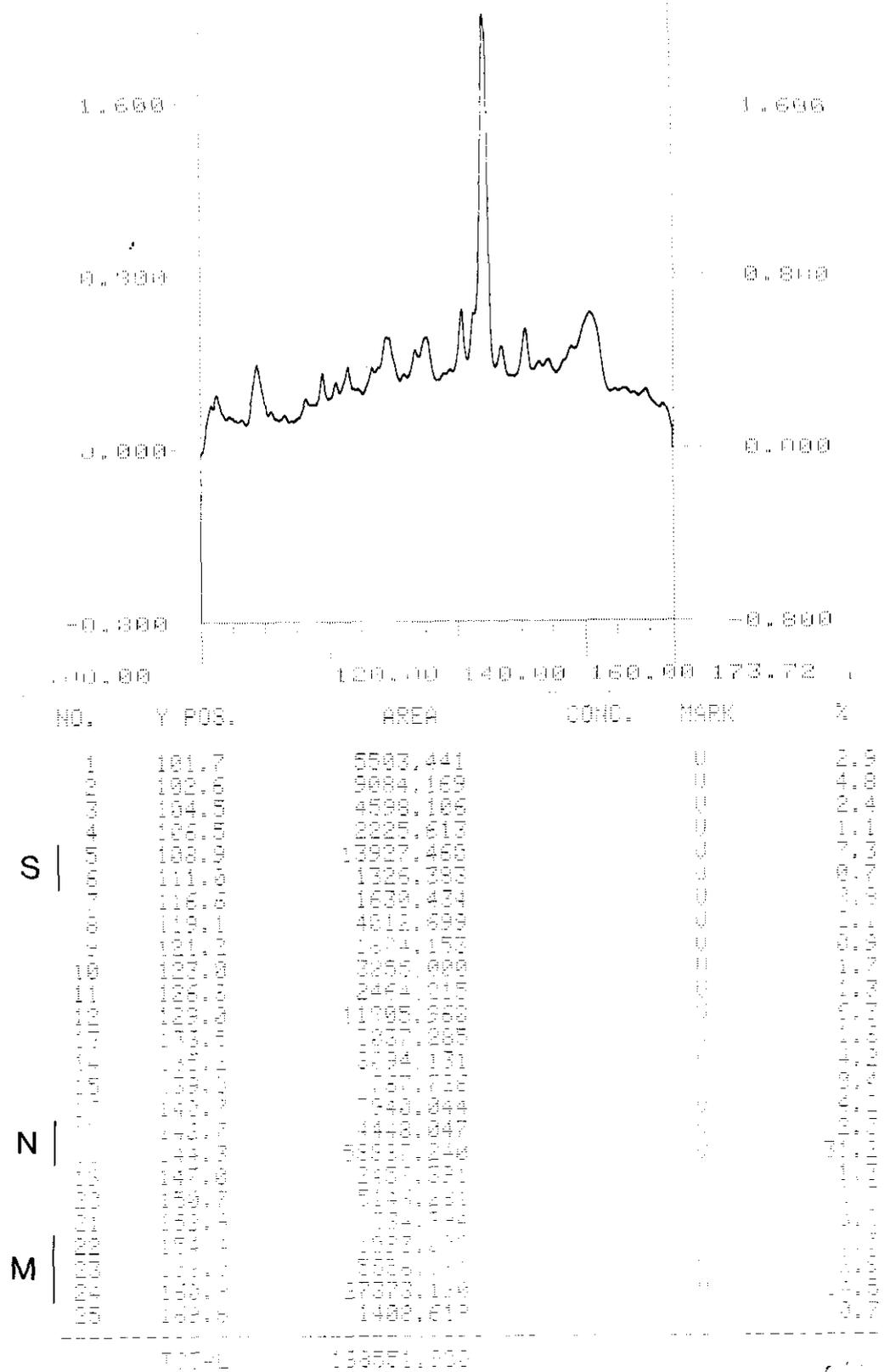
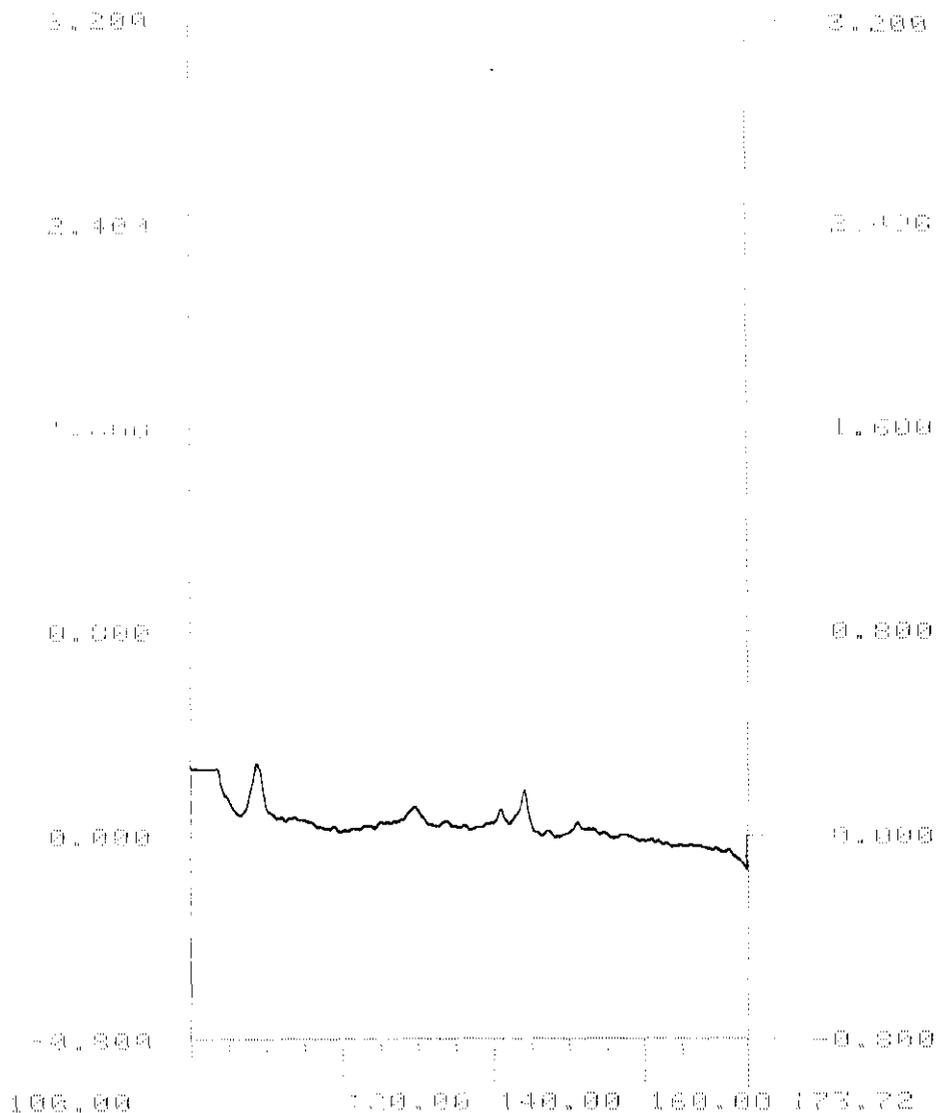
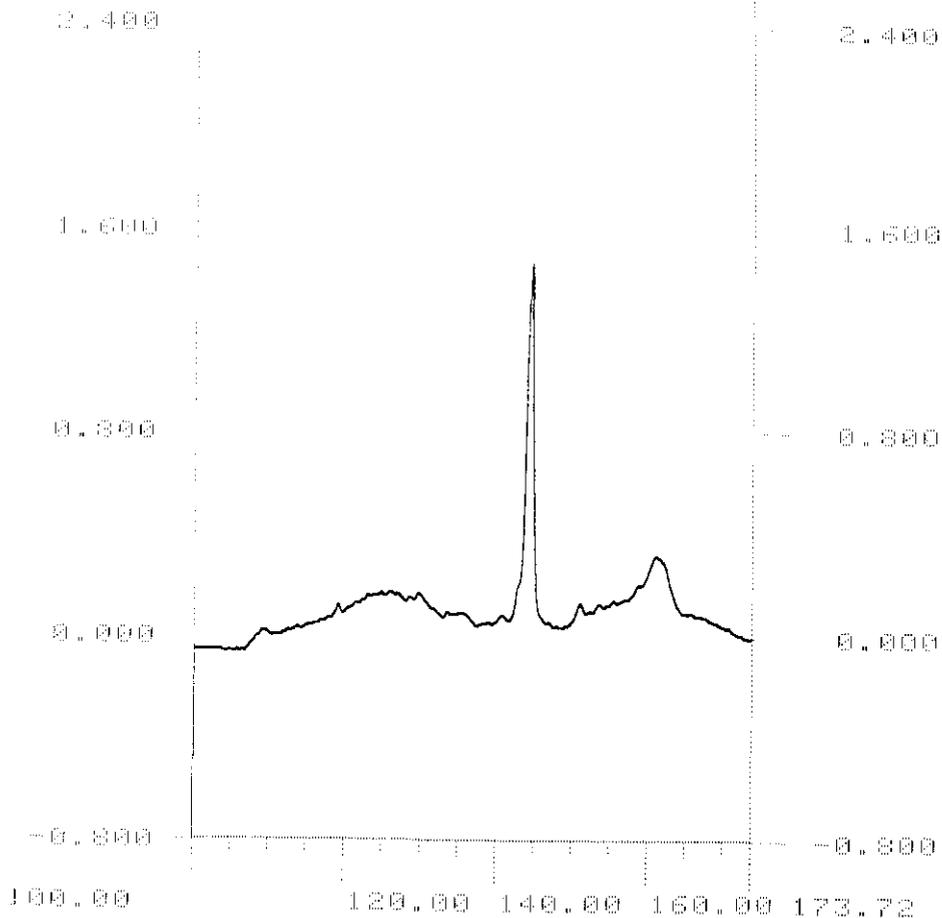


Fig. 8.- Análisis densitométrico del CVC completo (cepa P-Madrid/90) realizado a partir de un gel de poliacrilamida. En la tabla inferior se muestran los valores de las áreas expresados en porcentaje correspondientes a las distintas proteínas estructurales del virus.



NO.	Y POS.	AREA	CONC.	PAR.	%
S	132.1	1307.031			5.0
	133.8	2036.656			44.5
	139.5	2204.644			49.5
	141.5	1100.543			24.0
	144.7	4837.352			107.2
	151.2	948.867			4.0
	TOTAL		3231.310		

Fig. 9.- Análisis densitométrico de la fracción acuosa obtenida tras la solubilización del CVC (cepa P-Madrid/90) con Tritón X-114. En la tabla inferior se muestran el valor del área expresado en porcentaje correspondiente a la glicoproteína S del virus.



	NO.	Y POS.	AREA	CONC	MARK	%
N	139.1		1532.835			0.02
	140.1		6508.468			0.09
	141.1		6339.185			0.09
	142.1		7439.812			0.11
	143.1		8859.357			0.12
	144.1		12224.446			0.17
	145.1		41373.246			0.58
	146.1		756.527			0.01
	150.1		2534.753			0.03
	151.5		17274.376			0.24
	TOTAL		67914.698			

Fig. 10.- Análisis densitométrico de la fracción detergente obtenida tras la solubilización del CVC (cepa P-Madrid/90) con Tritón X-114. En la tabla inferior se muestran los valores de las áreas expresados en porcentaje, correspondientes a las proteínas N y M del virus.

IV.3.1.3. Virus completo: inactivación con beta-propiolactona (BPL)

Se llevaron a cabo diversas pruebas para la inactivación de la cepa P-Madrid/90 purificada empleando concentraciones finales de BPL del 0'05 y 0'10%.

Previamente se halló el título del virus, y éste resultó ser de $1'84 \times 10^7$ DI₅₀CT/ml.

Los ensayos de inactivación se llevaron a cabo a 37°C en agitación durante 24 horas. Con este largo período de incubación se asegura la total pérdida de virulencia y además la BPL se hidroliza totalmente y no es necesaria la adición de tiosulfato de sodio para detener la reacción.

Después de estos ensayos se comprobó "in vitro" la total inactivación del virus tratado con ambas concentraciones de BPL. Se eligió por tanto la menor concentración de agente inactivante (0'05%) para emplear en la prueba definitiva.

IV.3.2. Respuesta serológica

IV.3.2.1. Resultados obtenidos mediante seroneutralización frente a los distintos productos inoculados

Estos resultados aparecen en la tabla 7 agrupados de la siguiente forma: días 1 - 15 (fase I), días 16 - 43 (fase II) y días 44 - 60 de la experiencia (fase III). La fase I se corresponde con las tomas de sangre realizadas a partir de la primera administración de los productos, la fase II con las tomas llevadas a cabo tras la segunda inoculación y la fase III con las realizadas después de la contraprueba.

TABLA 7.- Resultados obtenidos mediante seroneutralización frente a los distintos productos inoculados. Los valores representados (inverso del título) se corresponden con la media aritmética de los títulos obtenidos en los dos animales inoculados con el mismo producto inmunógeno.

FASE	SANGRIA	PRODUCTOS ENSAYADOS				
		Glicoproteína S	Proteínas N+M	CVC completo	Vacuna comercial	Testigo
I	1 ^a	16	96	32	24	6
	2 ^a	192	96	32	24	6
	3 ^a	128	192	160	24	6
II	4 ^a	128	96	160	16	4
	5 ^a	96	64	64	24	8
	6 ^a	64	96	64	64	6
	7 ^a	384	128	96	64	6
	8 ^a	512	288	288	48	6
	9 ^a	512	96	96	48	8
III	10 ^a	512	512	512	64	16
	11 ^a	128	128	128	64	32
	12 ^a	192	192	128	128	192
	13 ^a	256	256	128	192	256

Estos resultados muestran la existencia de protección de monocapa (protección "in vitro" en todos los animales inoculados, independientemente del producto utilizado para la inmunización.

IV.3.2.2. Resultados obtenidos mediante ELISA frente a los distintos productos inoculados

Los resultados parciales se muestran en las siguientes gráficas, separados según las tres fases del ensayo (Fig. 11a, 11b y 11c). La fase I se corresponde con las tomas de sangre de la 1ª a la 3ª, la fase II con las tomas de 4ª a 9ª, y la fase III con las tomas 10ª a 13ª. Los resultados globales aparecen en la figura 11d. Cada símbolo representa el valor de un suero individual.

Los resultados obtenidos frente a los distintos productos se representan en la figura 12, donde se puede apreciar la cinética de las respuestas a lo largo de la prueba. En esta gráfica han sido seleccionadas las dos sangrías más significativas de cada fase. Cada símbolo representa el valor medio entre los dos animales inoculados con el mismo producto.

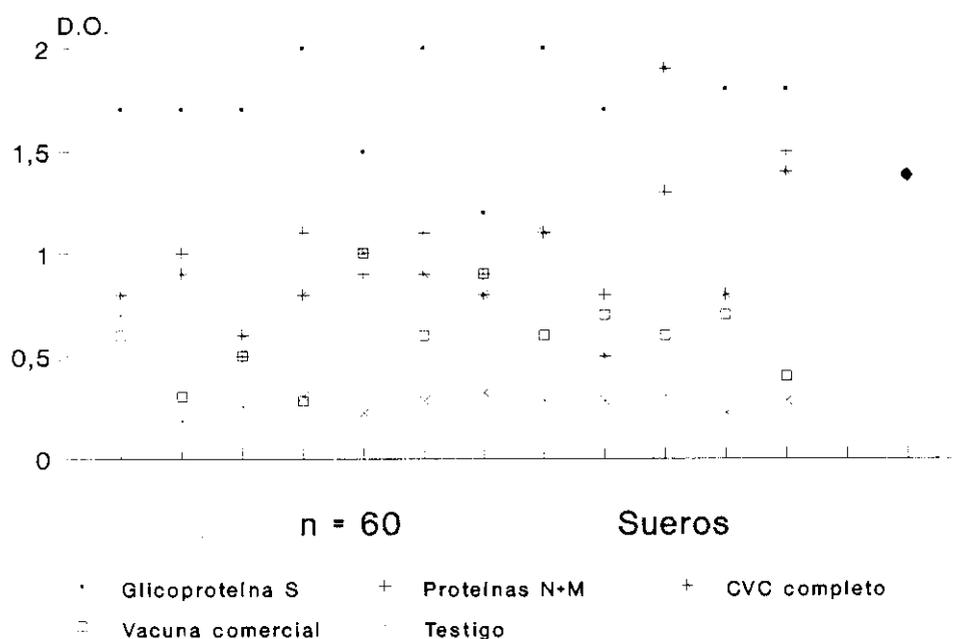
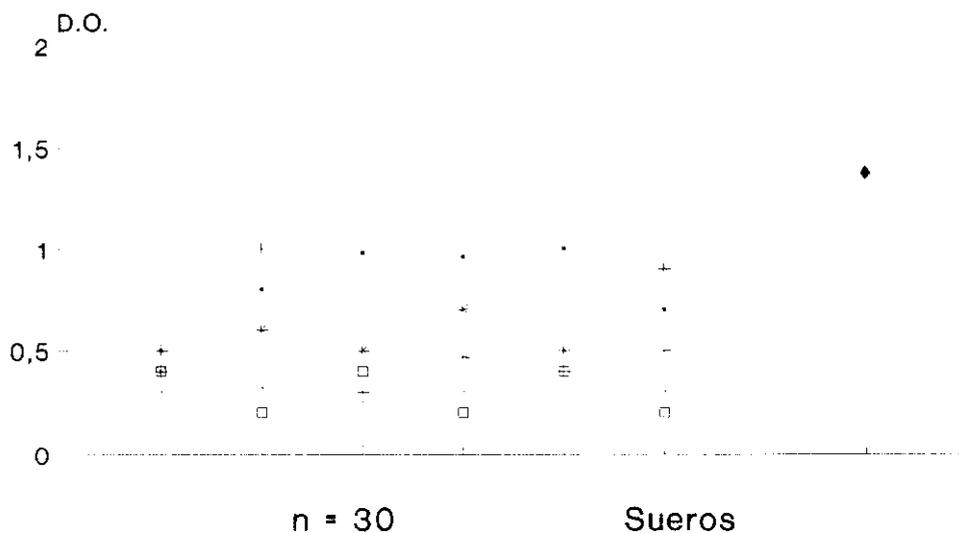


Fig. 11b

Figs. 11a y 11b.- Distribución de los valores obtenidos mediante el ELISA experimental frente a los productos inoculados durante las fases I y II del ensayo, respectivamente. Los símbolos \blacklozenge y \lozenge se corresponden con los valores de los sueros de referencia positivo y negativo, respectivamente. Lectura a 620 nm.

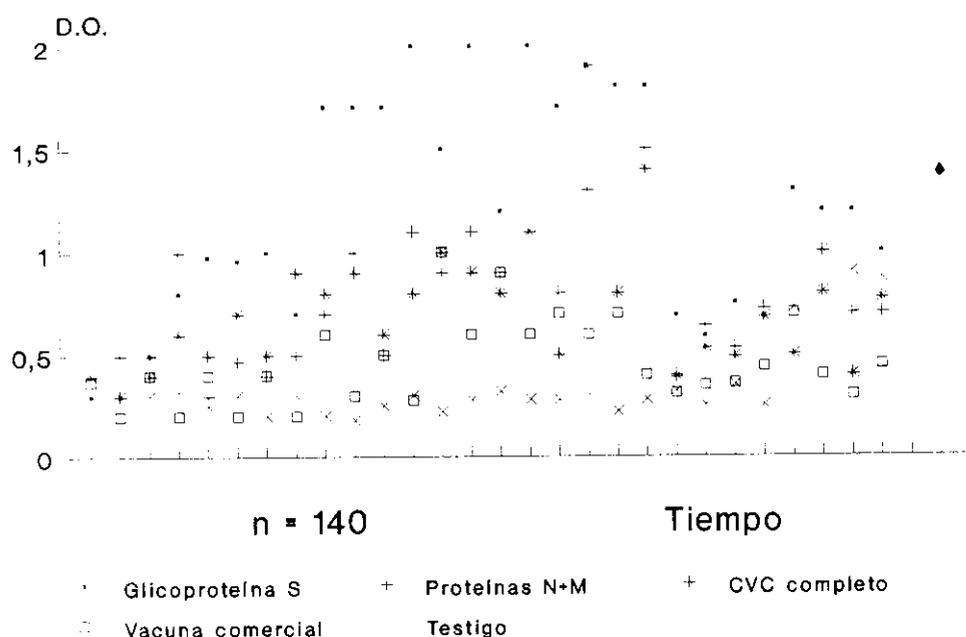
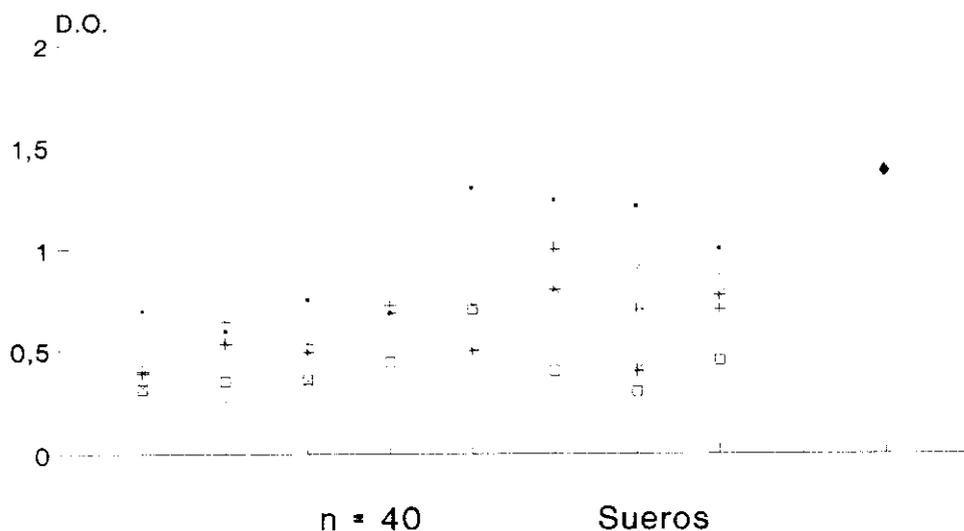


Fig. 11d

Figs. 11c y 11d.- Distribución de los valores obtenidos mediante el ELISA experimental frente a los productos inoculados durante la fase III del ensayo y representación de los resultados globales correspondientes a las tres fases del ensayo, respectivamente. Los símbolos \blacklozenge y \diamond se corresponden con los valores de los sueros de referencia positivo y negativo, respectivamente. Lectura a 620 nm.

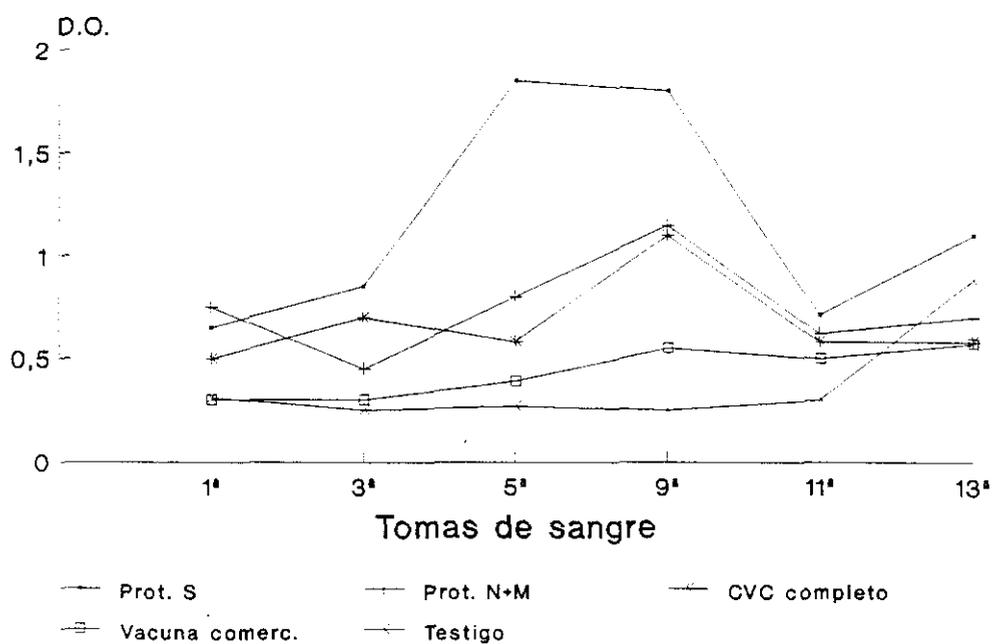


Fig. 12.- Cinética correspondiente al desarrollo de anticuerpos (ELISA experimental) frente a los distintos productos ensayados. Cada símbolo representa el valor medio entre los dos animales inoculados con el mismo producto. Lectura a 620 nm.

**IV.3.2.3. Resultados obtenidos mediante
inmunodetección de proteínas fijadas a
membranas de nitrocelulosa (ID) frente a
los distintos productos inoculados**

Esta técnica se empleó de nuevo para confirmar la especificidad de reacción frente a cada producto ensayado en los sueros correspondientes a los 10 animales de experimentación. Para realizar la prueba, se seleccionaron dos sangrías representativas de cada fase de la experiencia (1ª, 3ª, 5ª, 9ª, 11ª y 13ª). Los resultados que se muestran son los más significativos correspondientes a cada producto inoculado (Fotografía 14).

Los resultados obtenidos permitieron comprobar la especificidad de reacción de los distintos sueros frente a cada producto inoculado.

En las membranas que se incubaron con los sueros de perros inoculados con las distintas proteínas estructurales, se observó la aparición de las bandas correspondientes a las mismas.

En las tiras correspondientes a los sueros de perros inoculados con el virus completo (tanto la cepa de la vacuna comercial, como la de campo P-Madrid/90 inactivada), pudo comprobarse la aparición del patrón de proteínas característico del CVC. Este mismo perfil se verificó en las membranas incubadas con la totalidad de los sueros después de la contraprueba con la cepa P-Madrid/90 virulenta.

Se comprobó una correlación directa entre el título de los sueros obtenido mediante otras técnicas y la intensidad de las bandas.

IV.3.3. Resultados clínicos

IV.3.3.1. Sintomatología clínica

Las temperaturas rectales de los animales se mantuvieron entre 38.3 y 39°C durante los 14 días siguientes a la contraprueba, de forma semejante a lo observado durante la primera parte de la experiencia. Se constató así la ausencia de hipertermia durante todo el ensayo, al ser consideradas estas temperaturas como normales.

Los síntomas clínicos después de la contraprueba se observaron únicamente en aquellos animales inoculados con las proteínas N+M y en los testigos.

Los signos fueron de carácter leve y consistieron en la aparición de apatía en el día 48 y disminución de la consistencia de las heces entre los días 50 y 53 del ensayo (2º, 4º y 7º día post-contraprueba, respectivamente).

Estos resultados, junto con los relativos al aislamiento del CVC después de la contraprueba, se muestran en la tabla 8.

IV.3.3.2. Análisis hemático

Los parámetros hemáticos analizados oscilaron a lo largo de la prueba entre los rangos que se muestran a continuación en la tabla 9:

TABLA 9: Parámetros hemáticos analizados y valores obtenidos (promedio) a partir de los animales de experimentación a lo largo del ensayo.

Leucocitos totales	14'5 - 17 x 10 ³ /μl
Hematíes totales	0'36 - 6'38 x 10 ⁶ /μl
Hemoglobina	12'5 - 15 g/dl ó μl
Hematocrito	36 - 41 %
Volumen corpuscular medio (V.C.M.)	78'5 - 82'5 cμ
Concentración media de hemoglobina (C.M.H.)	23 - 24'2 pg
Concentración media de hemoglobina corpuscular (C.M.H.C.)	29'2 - 33'5 g/dl
Plaquetas	352 - 635 x 10 ³ /μl

Todos estos parámetros se mantuvieron dentro de los límites de la normalidad durante todo el ensayo.

IV.3.3.3. Análisis coprológico

En el análisis coprológico previo de los animales se detectó la presencia de ooquistes de coccidios pertenecientes al género **Isospora**.

Se procedió al tratamiento con una dosis por animal de 325 x 10³ UI de espiramicina y 75 mg de metronidazol durante 15 días. Los dos controles realizados posteriormente mostraron resultados negativos.

IV.3.4. Aislamiento del virus en heces después de la contraprueba

En la mayor parte de los animales se observó mediante ME la eliminación intermitente de partículas víricas en heces entre los días 49 y 55 del ensayo (3º y 9º día después de la contraprueba).

El aislamiento de CVC en cultivos celulares únicamente se logró en las muestras fecales recogidas entre los días 51 y 53 del ensayo (días 5º y 7º después de la contraprueba). Estas heces correspondieron a los perros inoculados con las proteínas N+M, virus vacunal y testigos. Los resultados obtenidos después del 9º día post-contraprueba fueron negativos.

Los resultados correspondientes a la aparición de síntomas clínicos y al aislamiento del virus en heces después de la contraprueba se muestran en la tabla 10.

Las abreviaturas correspondientes a esta tabla son:

SC: signos clínicos.

AV: aislamiento de virus a partir de hisopos rectales.

Tabla 10.- Aparición de signos clínicos y aislamiento de CVC en los animales de experimentación después de la contraprueba.

Nº ANIMAL	PRODUCTO INOCULADO	OBSERVACION	DIAS POST-CONTRAPRUEBA									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1	GLICOPROTEINA S	SC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		AV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	GLICOPROTEINA S	SC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		AV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	PROTS. N+M	SC	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
		AV	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
4	PROTS. N+M	SC	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
		AV	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
5	CVC COMPLETO	SC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		AV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	CVC COMPLETO	SC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		AV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	VAC. COMERCIAL	SC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		AV	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
8	VAC. COMERCIAL	SC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		AV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	TESTIGO	SC	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
		AV	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
10	TESTIGO	SC	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
		AV	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-

V. DISCUSSION

V. DISCUSION

La infección por el coronavirus canino (CVC) produce cuadros de gastroenteritis en los perros. Pueden verse afectados animales de cualquier edad, aunque en los jóvenes la enfermedad es más frecuente y reviste una mayor gravedad.

Las infecciones causadas por este virus se encuadran dentro del llamado "complejo entérico canino", en cuya etiología se encuentran implicados agentes víricos, bacterianos y parasitarios. El CVC ocuparía uno de los primeros lugares en importancia después del parvovirus canino (PVC). Es frecuente la aparición de infecciones mixtas en las que intervienen ambos virus de forma sinérgica.

En este tipo de cuadros de gastroenteritis puede apreciarse un rango definido de edades para la infección, situado éste en cachorros de 6 a 8 semanas de vida (Evermann y col., 1980; Binn y col., 1981; Edsall, 1989; Evermann y col., 1989).

Hasta el momento actual no se habían emprendido estudios sobre el CVC en nuestro país. La aparente contradicción entre el aumento de los casos clínicos de gastroenteritis en perros jóvenes y la vacunación sistemática de la población frente a parvovirus canino (principal patógeno en estos cuadros y, por lógica, en regresión), hizo que nos animásemos a trabajar en este tema.

El primer objetivo de este estudio fue intentar aportar algunos datos acerca de la **situación epidemiológica** de este síndrome en nuestro país y, en concreto, de la participación del **CVC** en el mismo. Una vez comprobada su presencia y realizado el **aislamiento de virus**, la investigación se orientó hacia aspectos relacionados con el **control y la prevención de la infección**.

Las **manifestaciones clínicas** derivadas de estas infecciones

duales o múltiples del tracto gastrointestinal son más graves que las producidas por un agente único. La compleja naturaleza de las enteritis caninas incrementa la relevancia del diagnóstico diferencial, ya que los síntomas causados por cada uno de ellos son prácticamente indistinguibles. Entre los signos clínicos más comunes se encuentran anorexia, vómitos y diarrea. Básicamente, toda la población encuestada presentó signos clínicos semejantes a los mencionados. En ningún caso se detectó la presencia de otros agentes víricos como calicivirus, adenovirus, enterovirus, etc...

El criadero canino "P" donde se logró el aislamiento, contaba con un historial de sucesivos episodios de gastroenteritis hemorrágica aguda entre sus camadas. En él se detectó la presencia de infecciones mixtas parvovirus-coronavirus, asociadas en la mayor parte de los casos con infestaciones parasitarias por nematodos.

El desarrollo de este tipo de historiales con cuadros clínicos recidivantes podría justificarse en este caso con base en dos hechos: por una parte, el CVC constituye un factor clave para el incremento de la patogenicidad del PVC, ya que estimula de forma indirecta la mitosis de las células de la cripta intestinal. Por otro lado, resulta muy significativa la asociación de diversos agentes parasitarios con la infección vírica (Appel, 1988; Evermann y col., 1989).

En general, las infecciones simples causadas por CVC suelen ser de carácter transitorio y autolimitante, pero no hay que olvidar que la circulación del virus persiste entre los animales del grupo.

La intervención de otros virus y/o de parásitos intestinales, junto a otras condiciones ambientales desfavorables, facilita el mantenimiento de los episodios de diarrea en una población cerrada.

En los cachorros del criadero "P" se demostró una infestación

masiva por nematodos de los géneros **Uncinaria**, **Toxascaris** y **Toxocara**. Esta situación es frecuente entre las camadas sometidas a condiciones deficientes de higiene. Los parásitos intestinales colaborarían así en la aparición de vómitos y diarrea, causando anemia y retraso en el crecimiento. La intensidad de los síntomas clínicos está relacionada con la magnitud de la infestación, la edad, el estado nutricional, las reservas férricas y la existencia de inmunidad adquirida (Miller, 1971; Soulsby, 1987).

En cuanto a las **características epidemiológicas**, hay que destacar que las infecciones por coronavirus cursan de forma habitual entre animales que conviven en comunidades cerradas (Evermann y col., 1989). Algunas encuestas serológicas realizadas han demostrado al menos el doble de prevalencia entre perros de criadero que entre perros de dueños particulares (Helfer-Baker y col. 1980). De hecho, el primer aislamiento de CVC en nuestro país se ha llevado a cabo entre los animales pertenecientes a una población cerrada (Martín Calvo y col., 1992).

Durante el período de seguimiento, pudo observarse una mayor incidencia clínica de la enfermedad en los meses de invierno (condiciones climáticas favorables para el agente etiológico) y también cuando se incrementaba la densidad de población en el criadero. Los brotes diarreicos fueron de aparición brusca y de difusión muy rápida entre los cachorros de las distintas camadas. Aproximadamente el período de incubación osciló entre 5 y 6 días. La morbilidad en cachorros fue prácticamente del 100% y la mortalidad del 25% aproximadamente. No se apreció sintomatología clínica en la población adulta, de forma semejante a lo observado por Keenan y col. en 1976. Este hecho puede explicarse en función de las especiales características fisiológicas de las células encargadas de la absorción intestinal durante el período neonatal y también por la mayor competencia inmunitaria del animal adulto (Wagner y col., 1973).

En nuestro estudio pudo confirmarse la existencia de seroconversión en las hembras reproductoras del criadero "P", lo cual indicó que padecieron una infección subclínica (Keenan y col., 1976).

Está claro, pues, que la elevada concentración animal y unas deficientes condiciones higiénicas, de manejo o alimentarias favorecerían la circulación y difusión de los distintos agentes que intervienen en estos procesos.

La **microscopía electrónica** (ME), por su rapidez y fiabilidad, se encuentra entre las técnicas más idóneas para el diagnóstico de los procesos diarreicos de etiología vírica (England y Poston, 1980; Jensen y col., 1980; Marcotegui, 1987). Además, es uno de los métodos más indicados para la detección de infecciones mixtas en las que intervienen dos o más agentes (ej: CVC y PVC, CVC y rotavirus canino o calicivirus, etc.) (McNulty y col., 1980; Roseto y col., 1980; Carmichael y Binn, 1981).

Algunas de las desventajas de la técnica en este caso residen en su incapacidad para distinguir virus pertenecientes al mismo grupo, la frecuente presencia en las heces de artefactos similares morfológicamente a coronavirus y la imposibilidad de automatización para el procesado de un número elevado de muestras (Hammond y Timoney, 1983).

El carácter autolimitante de esta virosis condiciona especialmente la sensibilidad de la ME, método que requiere una concentración mínima de 10^5 a 10^6 partículas por gramo de heces para la detección. Por ello, un factor que debe ser tenido en cuenta es el tiempo transcurrido entre la aparición de los síntomas clínicos y la recogida de la muestra. Es importante que este intervalo sea lo más breve posible.

Es posible proceder a la tinción negativa de muestras de heces

sin realizar concentración previa, pero este método sólo es efectivo si el contenido en virus es muy alto. Usualmente se emplea la ultracentrifugación, con el fin de incrementar la concentración de partículas (Flewett, 1978; Field, 1982; Doane y Anderson, 1987).

La congelación de las heces representa una dificultad añadida para el diagnóstico de infecciones por coronavirus mediante ME. Cuando se emplea este método para la conservación de las muestras, los peplómeros típicos de las partículas suelen desprenderse, dificultando enormemente la identificación (Tajima, 1970).

En nuestro estudio, se llevó a cabo la observación de partículas víricas a partir de material conservado en refrigeración. El almacenaje de estas muestras de heces a 4°C podría haber afectado la morfología de las partículas, haciéndola menos definida que la de las visualizadas en cultivo celular. Este hecho podría explicar las diferencias morfológicas observadas entre estos dos grupos de partículas.

A pesar de todo ello, la morfología y el tamaño de las partículas visualizadas se ajustó a las descritas para CVC (Takeuchi y col., 1976; Roseto y col., 1980; Vandenberghe y col., 1980; Williams, 1980; Yasoshima y col., 1983; Marshall y col., 1984; Turner, 1989). No se observó la presencia de ninguna forma semejante a las visualizadas por Schnagl y Holmes en 1978, por Williams en 1980 y por Marshall y col. en 1984. Estos autores describen la existencia de unas partículas semejantes a coronavirus ("coronavirus-like"), con un marcado pleomorfismo y de tamaño superior al descrito como característico de CVC.

El diámetro de las partículas observadas en nuestro estudio osciló entre 60 y 110 nm. No obstante, se hallaron algunas diferencias de tamaño entre los diámetros medios de los viriones teñidos negativamente (105 nm) y los observados en cortes de cultivos (75 nm). Estas diferencias podrían atribuirse a la técnica

empleada. En el primer caso se habría producido una hidratación de las partículas, aumentando ligeramente sus dimensiones, y en el segundo, el proceso de fijación necesario para los ultracortes habría inducido cierta retracción de las mismas (Mebus y col., 1973).

La disposición de los viriones observados a partir de material patológico fue en su mayor parte en forma de agregados, probablemente debido a la presencia de anticuerpos en el intestino.

La inmunomicroscopia electrónica (IME) resultó positiva y sirvió como prueba de identificación rápida del virus. El mayor tiempo requerido para la realización de esta técnica se compensa con una mayor rapidez en el examen de las rejillas (Kapikian y col., 1975; McFerran y col., 1978; Madeley, 1979). Se observó un notable incremento en la aglutinación de las partículas tras el tratamiento con suero hiperinmune, de modo semejante a lo descrito por otros autores (Doane, 1974; Berthiaume y col., 1981).

En nuestro estudio, el porcentaje de detección de virus en las heces mediante el empleo de técnicas de ME (7%), coincidió con los comunicados en otros países como Australia (Marshall y col., 1984) y Alemania (Herbst y col., 1988). Sin embargo, la tasa observada en Francia fue sensiblemente mayor (12%) (Roseto y col., 1980).

En la mayor parte de los casos, los autores australianos mencionados no encontraron una correlación directa entre diarrea y excreción de virus, a excepción de aquellos en los que se produjo una eliminación masiva de partículas.

El pequeño porcentaje de animales que elimina virus al medio en presencia o no de sintomatología, se encuentra en aparente contradicción con la elevada tasa de animales seropositivos dentro de la población canina. Ello sugiere que la mayor parte de las infecciones por coronavirus se mantienen de forma subclínica.

Los resultados obtenidos a partir de los cortes ultramicroscópicos concuerdan con los descritos por otros autores (Oshiro y col., 1971; Kojima y col., 1986). En relación con el ciclo de replicación del CVC, hay que mencionar que estos últimos autores tampoco visualizan fases de gemación en ningún momento de su estudio. Por otro lado, Ducatelle y col. (1981) comunican la gran variabilidad en la observación de estas fases de gemación dependiendo de la especie de coronavirus y del tipo de célula hospedadora.

Asimismo, se encontró una correlación directa entre la detección de partículas mediante ME y el **aislamiento de virus** en cultivo celular. A pesar de ello, el aislamiento de virus en la línea celular A-72 no pudo lograrse en todos los casos, posiblemente debido a los problemas en la conservación de estos agentes y a las dificultades en su adaptación para el crecimiento "in vitro" (Pensaert y Callebaut, 1978; Yasoshima y col., 1983; Resta y col., 1985).

Entre las relativamente pocas líneas celulares de origen canino establecidas, la A-72 ha demostrado grandes posibilidades para el estudio de algunos virus caninos. La marcada susceptibilidad de esta línea al CVC es de particular importancia, especialmente en células de alto pase. Esta característica la hizo muy adecuada para nuestro estudio.

El efecto citopático (ECP) observado por nosotros tras la inoculación de los cultivos con la cepa de campo aislada fue el típico (Binn y col., 1975; Binn y col., 1980).

Consideramos como modelo de cinética de infección "in vitro" la descrita por Yasoshima y col., (1983), aunque el sistema celular no fuese el mismo. Se consideran las 24 hpi como el momento en el que existe un mayor porcentaje de virus intracelular. Así, los inóculos recogidos en este momento de la infección se emplean para

la producción de virus, puesto que es muy elevada su proporción de partículas infectivas. Hacia las 48 hpi existe un mayor porcentaje de partículas extracelulares y, por tanto, se utilizan estos inóculos para la obtención de virus purificado.

La identidad del virus aislado se confirmó comparándolo con una cepa de CVC de referencia y mediante las técnicas de electroforesis en geles de poliacrilamida (**SDS-PAGE**) e inmunodetección de proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa (**ID**) (Laemmli, 1970; Towbin y col., 1979). Según nuestros resultados, el virus aislado presentó unas características fisicoquímicas y antigénicas (proteínas estructurales mayoritarias) que coincidieron con las ya descritas para el CVC (Garwes y Reynolds, 1981). Sin embargo, en las muestras analizadas no se observó la presencia de la glicoproteína mayoritaria de 22 Kd que describen estos autores. En nuestra opinión, cuando más, esta proteína poseería un carácter minoritario. En cualquier caso, y con el fin de realizar una determinación más exacta, sería preciso realizar otro tipo de análisis empleando virus marcado radiactivamente.

En cuanto al **diagnóstico serológico** de las infecciones por el CVC, hay que tener en cuenta que los títulos de anticuerpos en sangre circulante no proporcionan una información excesivamente útil. Ello se debe a la naturaleza localizada del proceso y a la relativa lentitud en el desarrollo de niveles detectables de anticuerpos en suero. Esta respuesta sérica aparece hacia el 14^º dpi, alcanzándose los títulos máximos entre el 40^º y 60^º dpi (Cartwright, 1973; Keenan y col., 1976).

A pesar de estas consideraciones, el empleo de diversas técnicas serológicas puede ser una ayuda importante en la determinación de la prevalencia de la infección en un momento determinado.

La **seroneutralización** ha sido la técnica más utilizada

tradicionalmente por su especificidad, tanto para diagnóstico como para estudios seroepidemiológicos relacionados con otros coronavirus entéricos (Toma y col., 1978; Rubio, 1988). Los estudios de Mochizuki y col., (1987) demuestran la elevada sensibilidad, fiabilidad y sencillez de la técnica de microneutralización en placa para estudios serológicos relacionados con CVC. Por estas razones, la hemos considerado como técnica de referencia a la hora de poner a punto nuevos métodos de diagnóstico.

Con un desarrollo más reciente, las **técnicas inmunoenzimáticas** presentan muchas ventajas frente a la seroneutralización. Algunas de ellas están relacionadas con aspectos económicos, la sencillez de manejo y la posibilidad de estandarización y automatizado. Todos estos aspectos son muy importantes cuando se pretende llevar a cabo estudios epidemiológicos amplios (Tuchiya y col., 1991).

Según Rimmelzwaan y col., (1991), la sensibilidad del ELISA indirecto para la detección de anticuerpos séricos frente a patógenos víricos como CVC, PVC o rotavirus es alrededor de 2 a 10 veces mayor que la de otros métodos como inhibición de la hemoaglutinación, seroneutralización o fijación de complemento.

En nuestro estudio se puso a punto un método inmunoenzimático empleando la cepa aislada (P-Madrid/90), con el fin de comparar y analizar sus resultados frente a la seroneutralización y frente a otro ELISA comercial.

El análisis de los resultados obtenidos con cada una de estas técnicas (empleando sueros de campo y/o experimentales) permitió comprobar unas elevadas sensibilidad y especificidad para el ELISA desarrollado en nuestro laboratorio. Estas fueron del 80 y 90%, respectivamente. Asimismo, se observó una buena concordancia entre ambos métodos inmunoenzimáticos (valor kappa = 0'64).

Los resultados obtenidos tras valorar algunas mezclas de sueros positivos y negativos permiten deducir que, para discriminar un suero como positivo mediante el ELISA experimental, se requiere una dilución menor que para la técnica comercial. Ello confirma una sensibilidad ligeramente superior para este último método.

Pudo apreciarse la escasez de fondos inespecíficos en diluciones bajas de sueros negativos empleando el ELISA desarrollado por nosotros. En cambio, se observó una elevada frecuencia de presentación de estos fondos con la técnica comercial.

Como consecuencias probables, en primer lugar, el empleo del método comercial en un estudio epidemiológico provocaría una sobreestimación del número de animales seropositivos. En segundo lugar, la menor sensibilidad del ELISA experimental haría que animales con títulos bajos de anticuerpos no fuesen detectados como seropositivos.

A pesar de estas consideraciones, el enzimoimmunoensayo desarrollado resultó adecuado para el diagnóstico colectivo y la confirmación de episodios de enfermedad. La obtención de diversas muestras de sangre a partir de los mismos animales con intervalo de varias semanas, permitió aumentar la sensibilidad de la prueba.

Por otro lado, con el fin de contrastar resultados obtenidos mediante otras técnicas y de comprobar la especificidad de la respuesta sérica de los animales analizados, se empleó una prueba de **inmunodetección de proteínas** fijadas a membranas de nitrocelulosa. Actualmente, este tipo de técnica ofrece una sensibilidad y una versatilidad reconocidas, así como múltiples posibilidades en el campo del diagnóstico (Towbin y col., 1979; Gershoni y Palade, 1983).

No hemos hallado en la literatura ningún estudio acerca del

CVC en el cual se emplee la inmunodetección. Sin embargo, en nuestro caso los resultados obtenidos con ella fueron muy satisfactorios. Se realizó un análisis sobre una muestra de sueros que presentaba resultados opuestos mediante ambas técnicas ELISA. Los resultados obtenidos mostraron un elevado grado de acuerdo entre la inmunodetección y el enzimoimmunoensayo desarrollado por nosotros.

En conclusión, su sencillez de realización, su sensibilidad y especificidad, así como su elevado grado de acuerdo con otras técnicas, hicieron del ELISA experimental el método más idóneo para el diagnóstico serológico de rutina.

Por otro lado, la ID permitió confirmar la especificidad de la respuesta inmunitaria en los animales seropositivos. En ellos, la proteína mejor reconocida fue la proteína N (50 kD). Sin embargo, la glicoproteína S (204 kD) a pesar de ser la más inmunogénica "in vivo", es muy poco reactiva mediante esta técnica. Este fenómeno obedece a que la mayoría de sus epítomos son conformacionales y por tanto sensibles a la desnaturalización por el detergente aniónico SDS (Jiménez y col., 1986; Correa y col., 1988).

Además del hecho anteriormente mencionado, en general, las proteínas de alto peso molecular se transfieren con una menor eficacia. Este problema puede ser soslayado aumentando el período de transferencia o adicionando un detergente (como el SDS) al tampón con el fin de facilitar la elución (Jiménez y col., 1986; Correa y col., 1988).

Otro aspecto de los resultados serológicos estaría en función del origen de la población canina analizada (criaderos y Centro de Protección Animal de Cantoblanco). Los porcentajes de seropositividad obtenidos empleando ambos métodos ELISA, fueron siempre mayores en la población cerrada (superiores al 50%).

Estos datos concuerdan con los comunicados por Helfer-Baker y col., (1980) acerca de infecciones duales por CVC y PVC en EEUU. También coinciden con aquellos descritos por Osterhaus y col., (1980) y por Rimmelzwaan y col., (1991) en Holanda.

Por el contrario, Evermann y col. (1980) y Binn y col., (1981) describen porcentajes de seropositividad menores del 50% en poblaciones cerradas. A pesar de ello, en estos últimos estudios se sigue manteniendo la proporción de animales seropositivos entre los dos tipos de poblaciones (siempre menor en la abierta). Asimismo, los porcentajes de animales con títulos elevados se mantuvieron constantemente superiores en la población cerrada. Este hecho coincide con lo comunicado por Rimmelzwaan y col. en 1991, quienes describen porcentajes de animales con títulos mayores o iguales a 1/160, de un 22% y un 5% para criadero y para población abierta, respectivamente.

En nuestro estudio, todas las encuestas se realizaron sobre perros no vacunados y, por tanto, los resultados son válidos para interpretar la circulación del CVC en las distintas poblaciones.

A partir de los estudios serológicos realizados durante los años 1980 y 1991 por diversos autores, puede deducirse un aumento en la circulación de este virus. Osterhaus y col. en 1980 obtienen unas cifras de seropositividad del 78% en criaderos y del 16% en población abierta, mientras que Rimmelzwaan y col. en 1991 encuentran un 61% y un 45%, respectivamente. El período de tiempo que separa estas dos encuestas pone de manifiesto la difusión mayoritaria del CVC en poblaciones abiertas durante los últimos años. Este hecho sirve además para apoyar la hipótesis que se esgrimió inicialmente acerca del aumento actual de la incidencia clínica de los cuadros de gastroenteritis canina.

Debido a ello, nuestros esfuerzos se orientaron hacia aspectos relacionados con el **control** y la **prevención** de las infecciones por

CVC. Así, se procedió a realizar un **ensayo experimental** comparado acerca del poder inmunógeno de distintos componentes del virus.

Con respecto a la preparación de los productos ensayados haremos algunas consideraciones previas. En primer lugar, el periodo de inactivación con betapropiolactona del CVC purificado fue superior al empleado por otros autores (Stone y Hess, 1967). Estos investigadores emplean 60 minutos, pero indican que este tiempo y la concentración del agente inactivante pueden ser aumentados. El incremento de ambos parámetros está en relación directa con la seguridad sobre la inactivación completa del virus. Existen, sin embargo, ciertos límites en cuanto a los tratamientos para que no se produzcan cambios antigénicos.

Por otra parte, se consideró suficiente un periodo de tiempo de 24 horas para la total hidrólisis de la betapropiolactona, no siendo necesaria la adición de tiosulfato de sodio para detener la reacción (Ruiz Gonzalvo, comunicación personal).

En segundo lugar, para la solubilización de proteínas se empleó Tritón X-114. La elección de este detergente se debió a que la separación de fases se logra a una temperatura menor que en el caso de otros agentes (20°C). Ello permitió la obtención de proteínas en forma nativa, con mínimas alteraciones estructurales (Bordier, 1981). Así, las ventajas de su uso son evidentes frente al tratamiento con Tritón X-100, agente hasta ahora comunmente empleado en este tipo de extracciones y cuya temperatura de separación de fases es de 60°C (Helenius y Simons, 1972; Makino y col., 1973).

El método de valoración de proteínas de Lowry permitió la cuantificación proteica del CVC completo y de la glicoproteína S presente en la fase acuosa. La valoración de las proteínas N+M se vió dificultada, al quedar éstas formando micelas mixtas con el detergente tras el proceso de solubilización. Esta valoración, sin

embargo, se ajustó de forma indirecta, ya que mediante densitometría fue posible establecer el grado de pureza de las distintas proteínas y la proporción de las mismas en la muestra analizada (Lowry y col., 1951).

La potencialidad de los distintos productos ensayados como agentes inmunógenos para la prevención de la infección por CVC, fue básicamente evaluada mediante la respuesta humoral de los animales inoculados (dos dosis) frente a cada uno de ellos. Finalmente, se valoró la protección generada "in vivo" tras una infección experimental con virus virulento.

La inmunidad local, representada por la IgA secretora de la mucosa intestinal, es la principal responsable de una respuesta eficaz frente a esta infección. Así, los anticuerpos humorales no desempeñan un papel muy relevante en términos de protección, aunque sus niveles constituyen un indicador útil de la situación inmunitaria del animal frente a este virus entérico (Curtis y Bourne, 1971; Gupta, 1971; Appel, 1987; Pollock y Carmichael, 1990).

Un factor limitante en todos estos tipos de prueba experimental es la edad de los animales inoculados. En nuestro caso se utilizaron animales de cuatro meses de edad, debido a la disponibilidad inmediata de un lote homogéneo, a la ausencia absoluta de inmunidad de origen pasivo y a que las recomendaciones internacionales para la inmunización frente a CVC están cifradas a partir de las doce semanas de vida (Greene, 1984).

Mediante la técnica de **seroneutralización** se observó la aparición de anticuerpos hacia el 8º día de la experiencia. Los títulos más elevados antes de la administración de la segunda dosis de los distintos productos, se alcanzaron entre los días 12 y 15 del ensayo. Estos valores se incrementaron después de la segunda dosis, alcanzándose el máximo el día 39 del ensayo (24 días tras la

segunda inoculación).

Tennant y col., en 1991, detectaron anticuerpos a partir del 10° dpi mediante esta misma técnica, niveles que se incrementaron gradualmente hasta el 14 dpi. En otro estudio experimental, Tuchiya y col. en 1991 observaron la aparición de anticuerpos más tempranamente (7° dpi), para alcanzar de igual forma los niveles máximos hacia el 14° dpi. Sin embargo, otros investigadores comunican la existencia de seroconversión a partir del día 21 (Binn y col., 1974; Keenan y col., 1976).

El aumento de la cifra de anticuerpos neutralizantes se considera un signo de recuperación tras la infección, ya que suele coincidir con el cese de excreción de virus y con la desaparición de los síntomas clínicos (Greene, 1984; Tennant y col., 1991a). En general, se acepta que los animales con títulos mayores o iguales a 1/4 presentan cierto grado de protección (Edwards y col., 1985).

En nuestro estudio, la cinética de anticuerpos se ajusta al modelo de respuesta inmunitaria primaria establecido (Keenan y col., 1976; Appel y col., 1980; Fulker y col., 1986; Appel, 1988). Sin embargo, tras la administración de la segunda dosis, se observa un desarrollo más lento de la respuesta. Este hecho se justifica al considerar la presencia de una elevada cifra de anticuerpos en el momento de la administración de la dosis de recuerdo.

El fenómeno de ralentización de la respuesta inmunitaria ha sido observado en otras ocasiones, y en individuos jóvenes se ha relacionado con la presencia de anticuerpos de origen pasivo. (Greene, 1984; Heckert y col., 1991).

En otras pruebas experimentales de infección se ha llevado a cabo la valoración de la respuesta inmunitaria mediante técnicas inmunoenzimáticas (Ingersoll y Willie, 1988; Heckert y col., 1991).

Empleando el ELISA puesto a punto en nuestro laboratorio, la detección de anticuerpos comenzó el 8° dpi y las cifras más elevadas se alcanzaron el 25° dpi (10 días tras la segunda administración del producto). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Tuchiya y col. en 1991, quienes comunican la aparición de anticuerpos el 11° dpi, para lograr valores máximos el 22° dpi.

En líneas generales, nuestros datos indican que la detección de anticuerpos frente a los distintos productos inoculados fue más temprana cuando se utilizó la seroneutralización que cuando se empleó el ELISA. Este hecho está relacionado con el tipo de inmunoglobulina detectado mayoritariamente por cada técnica. Con la primera de ellas se detecta principalmente IgM (generada durante los estadios tempranos de la infección), mientras que con la segunda se detecta básicamente IgG, de inducción más tardía (Tennant y col., 1991a; Tuchiya y col., 1991).

Con respecto a la respuesta inmunitaria específica frente a cada producto administrado, hemos de realizar algunas consideraciones. Genéricamente, los animales inoculados con las proteínas estructurales por separado (S y N+M) desarrollaron anticuerpos más rápidamente que los inoculados con virus completo.

Los niveles séricos alcanzados por los animales inoculados con las proteínas N+M y los del virus completo aislado de campo fueron muy semejantes.

Los dos productos integrados por el virus completo se comportaron como agentes inmunizantes poco activos, especialmente la vacuna comercial. Este hecho podría deberse simplemente a una diferencia de dosis (10^4 y 10^3 DI_{50CT} , para el aislado de campo y el virus comercial, respectivamente).

Mediante seroneutralización, frente a las proteínas N+M ya se

apreció una respuesta en la primera toma de muestras (7º dpi), mientras que frente a la glicoproteína S se detectó en la segunda (12º dpi). Probablemente, ello implique que la respuesta serológica frente a las proteínas N+M estuviese mayoritariamente mediada por IgM, mientras que en el caso de la S haya predominado la IgG. Esta interpretación de nuestros resultados está de acuerdo con los estudios realizados por Heckert y col. en 1991.

Estos autores realizaron un tipificación de inmunoglobulinas en terneras inoculadas con las distintas proteínas estructurales del coronavirus bovino. En su caso, no se detecta la presencia de IgM en los animales inoculados con las proteínas M ni S, y, en cambio, sí aparece en aquellos inoculados con la proteína N. Así, la respuesta inducida por las primeras estaría mediada por IgG exclusivamente.

En nuestro estudio, ya se detectó mediante ELISA una respuesta significativa frente a las proteínas S y N+M a partir de la primera toma de muestras. Este hecho parece lógico si consideramos que esta técnica posee una capacidad de detección de una gama más amplia de isotipos, en comparación con la seroneutralización.

Por último, en algunos ensayos realizados con gatos inoculados con coronavirus, se ha descrito el desarrollo de una buena respuesta sérica frente a las proteínas N y M, en ausencia, en cambio, de título neutralizante (Ingersoll y Wylie, 1988).

Podría suponerse, después de analizar los datos serológicos obtenidos, que todos los animales inoculados resultaron protegidos. Para valorar realmente este grado de protección "in vivo", se llevó a cabo una **contraprueba** con la cepa P-Madrid/90.

Tras ella, se apreció un aumento significativo de anticuerpos en los perros inoculados con la glicoproteína S y en los testigo, a diferencia del incremento poco notable obtenido con el resto de

los productos ensayados. Este hecho pudo deberse a los elevados niveles de anticuerpos presentes en el momento de la contraprueba. En consecuencia e independientemente del producto inoculado, la respuesta frente al desafío no podría resultar muy enérgica. Esta circunstancia es comparable, por ejemplo, a la situación planteada en cuanto a la elección del momento de administración de una dosis vacunal en cachorros. En principio, no será nunca recomendable administrarla en presencia de grandes cantidades de anticuerpos de origen materno (Saif y Smith, 1985; Marshall y Frank, 1975; Van Zaane y col., 1986).

Por otro lado, hubiera sido deseable seguir durante más tiempo la evolución de la respuesta inmunitaria tras el desafío. Sin embargo, catorce días se consideraron suficientes para el seguimiento de la excreción de partículas víricas y para la observación de síntomas clínicos.

En nuestro ensayo, únicamente se observó la eliminación de partículas víricas entre el día 3º y 9º después de la contraprueba. Este periodo de tiempo concuerda con lo observado por Appel (1987). Sin embargo, otros autores describen periodos de excreción mayores, hasta los días 16º y 12º después de la contraprueba (Keenan y col. en 1976 y Tennant y col. en 1991, respectivamente).

En los animales inoculados con las proteínas N+M y en los testigo se observó una mayor eliminación de partículas, así como el desarrollo de signos clínicos leves. Aunque estos animales desarrollaron anticuerpos neutralizantes (protección "in vitro"), no resultaron inmunes "in vivo". Los anticuerpos neutralizantes pueden no proporcionar inmunidad frente a la reinfección, como han podido observar otros autores (Greene, 1984).

Por otra parte, la excreción de virus en estos perros fue diaria, a diferencia del resto, en los que fue intermitente. Sólo

se logró el aislamiento del virus en cultivo celular a partir de los animales inoculados con las proteínas N+M, la vacuna comercial y los testigo, durante los días 5º y 6º después de la contraprueba.

Los anteriores resultados están en la misma línea que los obtenidos por otros autores, tras la administración de VGPT completo y distintas subpartículas víricas a cerdos por vía intramamaria y a conejos por vía subcutánea e intramuscular. Comprobaron que los animales inoculados con el virus completo y la glicoproteína S desarrollaban anticuerpos neutralizantes, lo que no sucedió en aquellos inoculados con otras subpartículas víricas (Garwes y col., 1978/79).

La reproducción experimental de un cuadro clínico siempre presenta dificultades (Appel y col., 1979a). La escasa gravedad de los síntomas observados durante la experiencia posiblemente estuvo relacionada con diversos factores. La edad de los animales es uno de ellos, ya que generalmente el incremento de este parámetro se acompaña de una disminución en la gravedad del cuadro clínico (Appel, 1987).

Otros factores condicionantes habrían sido el origen y la dosis de virus empleados para la contraprueba. La cepa de campo que se utilizó (P-Madrid/90), fue aislada a partir de un cachorro que había padecido la enfermedad natural. Aunque el inóculo utilizado fue de bajo número de pase, podría haber existido cierto grado de atenuación durante su adaptación al cultivo "in vitro". Sin embargo, la dosis de inóculo empleada en nuestro ensayo es comparable a las descritas por otros autores (Keenan y col., 1976; Takeuchi y col., 1976).

Por último, en las infecciones experimentales los factores externos se mantienen bajo control, mientras que el curso de las infecciones naturales se ve influido por otros agentes

gastroentéricos y diversos factores medioambientales.

En resumen, a partir de la infección experimental tomada en su conjunto podría deducirse que:

- la glicoproteína S resultó ser la más inmunógena, tanto por los títulos de anticuerpos alcanzados como por la ausencia de síntomas en los animales inoculados.

- las proteínas N+M también se comportaron como agentes inmunizantes, aunque no indujeron niveles de anticuerpos séricos tan elevados como la glicoproteína S. Pudo demostrarse, en cambio, la ausencia de protección "in vivo" en los animales inoculados con estas proteínas.

- las cifras séricas de los perros vacunados con la cepa de campo fueron semejantes a los valores obtenidos con las proteínas N+M. Por el contrario, en el primer caso existió protección "in vivo".

- los animales inoculados con la vacuna comercial desarrollaron unos niveles inmunitarios claramente inferiores a los inducidos por los productos anteriormente citados, aunque estuvieron protegidos frente a la enfermedad clínica.

Los problemas relacionados con la aparición de cuadros clínicos de gastroenteritis aguda en perros con un historial de vacunación aparentemente adecuado, han sido discutidos en detalle por Carmichael (1983). En este hecho están imbricados un gran número de factores, como la interferencia con la inmunidad materna, la etiología múltiple del complejo entérico canino y la cepa y la virulencia de los agentes implicados. Otro factor importante residiría en la inmunidad de escasa duración inducida por el carácter localizado de la infección en el tracto gastrointestinal (Carmichael, 1983; Pollock, 1983; Greene, 1984).

En España, actualmente, no se lleva a cabo una vacunación sistemática de la población canina frente al CVC. Sin embargo, la prevención frente a este virus puede desempeñar un papel relevante para el control de las infecciones incluidas en este complejo entérico canino.

Los títulos de anticuerpos de origen pasivo en los criaderos afectados suelen ser bajos, y persisten en lactantes únicamente durante las 4 o 5 primeras semanas de vida (Edsall, 1989).

La inmunidad más efectiva frente al CVC está mediada esencialmente por las inmunoglobulinas secretoras del tipo A (inmunidad local). Las IgA son las que predominan en la leche, y son responsables de la inmunidad pasiva del lactante y de la protección activa intestinal. La secreción de este tipo de inmunoglobulinas es inducida mediante la administración oral del virus virulento, pero no se produce con el atenuado. (Crabbe y Heremans, 1966; Tomasi y Bienenstock, 1968; Gupta, 1971; Abou-Youssef y Ristic, 1972; Abou-Youssef y Ristic, 1975; Appel, 1987; Pollock y Carmichael, 1990).

Así, tomando en cuenta las consideraciones anteriores, la inmunización debería dirigirse en dos direcciones: la primera iría encaminada hacia la vacunación de las hembras reproductoras, con el fin de inducir unos niveles elevados de anticuerpos calostrales que proporcionarían una protección pasiva eficaz a los cachorros. La segunda pauta de actuación sería estimular, en el momento adecuado, la inmunidad sistémica y local para mantener unos niveles de anticuerpos idóneos en la población (Haelterman, 1965; Welliver y Ogra, 1978).

No existen ventajas suficientes que justifiquen el empleo de vacunas atenuadas para el control de las infecciones por el CVC. Como ya se ha mencionado, en 1983 se registró en EEUU una vacuna elaborada con CVC atenuado. Fue retirada del mercado poco tiempo

después debido a las reacciones adversas observadas tras su administración (Martin, 1985).

La frecuencia y gravedad de las infecciones por el CVC no parecen numéricamente muy importantes a nivel mundial, aunque las cifras de prevalencia sérica sí sean muy elevadas. Ello significa "a priori" que las infecciones inaparentes son muy frecuentes y que, en líneas generales, el estatus inmunitario de la población canina es elevado. Todas estas circunstancias parecen aconsejar el empleo de vacunas inactivadas, ya que no es necesario "sustituir" las cepas de campo circulantes por un virus vacunal atenuado.

A partir de 1985, nuevamente en EEUU, se aprobó una vacuna inactivada (Duramune Cv-K, Laboratorios Fort Dodge) (Edwards y col., 1985; Fulker y col., 1986). Este producto sigue empleándose en la actualidad y es el de mayor difusión en aquellos países donde se permite la inmunización frente a este virus. La administración de este tipo de vacunas inactivadas en un número importante de criaderos con problemas de enteritis, ha logrado disminuir la incidencia clínica de la enfermedad.

Los estudios realizados sobre distintos coronavirus en los últimos años han permitido identificar la localización de los principales epítomos críticos para su neutralización. Los lugares más relevantes, desde este último punto de vista, se encuentran ubicados en los peplómeros de superficie. Se ha demostrado que anticuerpos monoclonales dirigidos frente a epítomos específicos de la glicoproteína S, son capaces de neutralizar al virus "in vitro" (Fiscus y col., 1985; Jiménez y col., 1986). Ello puede indicar que la magnitud de la respuesta no es tan importante como el epítomo hacia el que van dirigidos los anticuerpos.

La posible aplicación de estas **subunidades víricas** en el campo de la prevención ya ha sido puesta de manifiesto por diversos autores (Pensaert y Callebaut, 1978; Gough y col., 1983a; Gough y

col., 1983b). Como ejemplo de esta posibilidad, podemos mencionar los ensayos de Garwes y col., (1976), quienes inocularon proyecciones de VGPT purificadas a cerdas por vía intramamaria y comprobaron posteriormente la inducción de anticuerpos neutralizantes en suero y calostro.

En otros estudios realizados con el VGPT también pudo comprobarse el desarrollo de una respuesta inmunológica significativa, tras la administración a cerdos y conejos por diversas vías de virus completo y de distintas subunidades del mismo. Los animales inoculados con el virus completo y las subunidades integradas por la glicoproteína S, desarrollaron anticuerpos neutralizantes. No sucedió así con los inoculados con las otras subunidades (Garwes y col., 1978/79).

Otros autores, tras la inoculación de gatos con VPIF virulento, obtienen resultados que concuerdan con los anteriores. Los animales que sobreviven a la contraprueba muestran una mayor correlación entre la respuesta sérica frente a la glicoproteína S y el título de anticuerpos neutralizantes. La mortalidad es muy elevada en los gatos con una marcada respuesta frente a las proteínas N y M (Ingersoll y Wylie, 1988).

En conclusión, podemos destacar que los resultados obtenidos en nuestro estudio con la glicoproteína S del CVC son esperanzadores y, cuando menos, comparables a los obtenidos con el virus completo.

La cantidad de antígeno precisa para generar una inmunidad adecuada es muy elevada y, por tanto, sería más eficaz y económico emplear únicamente aquellos antígenos específicos implicados en la protección. La producción de estos antígenos puede llevarse a cabo mediante el clonaje de los genes que los codifican y/o la secuenciación del epítipo específico y posterior obtención de oligopéptidos sintéticos (Lerner, 1983; Spaan y col., 1989).

Estas vacunas pueden producirse en bacterias, en levaduras o en células eucarióticas, de la misma forma en que ya se ha realizado con distintos virus como el de la fiebre aftosa, el herpes simplex, la hepatitis B y el parvovirus canino (Davis y col., 1981; Hackett, 1990; McGhee y col., 1992; López Turiso, 1992).

El mayor inconveniente en este tipo de producción de vacunas a nivel industrial, reside en la necesidad de unos medios e instalaciones adecuados y en algunas ocasiones novedosos, que permitan el cultivo y mantenimiento de los microorganismos vectores. El rendimiento y obtención de recombinantes es un aspecto que debería ser objeto de un minucioso estudio económico.

A la vista de todos los resultados obtenidos en este estudio, podríamos apuntar algunas directrices de lo que, a nuestro juicio, habría de realizarse en un **futuro**. En primer lugar, nos parece necesario confeccionar un mapa geográficamente representativo de la prevalencia de esta infección en España, ya que estos datos se desconocen en la actualidad. Para ello, y dada la eficacia de la técnica ELISA desarrollada en nuestro laboratorio, esta última podría emplearse en la prospección, lo que permitiría además un mayor contraste de resultados. Aunque en la actualidad ya se encuentra registrada una vacuna comercial en nuestro país, este hecho ha tenido lugar hace pocos meses. Por tanto, la encuesta serológica mencionada podría llevarse a cabo aún entre animales no vacunados.

Desde el punto de vista epidemiológico, debería realizarse un estudio de los diversos factores que condicionan la prevalencia como: grupos de edad, circulación del virus, comparación de los resultados obtenidos con diferentes protocolos de vacunación, estudio de los cuadros clínicos, presencia de infecciones intercurrentes, etc...

Otro aspecto importante para el diagnóstico de estas infecciones por CVC, residiría en el desarrollo de una técnica inmunoenzimática rápida que permitiera la detección de partículas en heces. Ello supondría una producción previa de anticuerpos monoclonales específicos para incluirlos en un sistema ELISA de doble anticuerpo, de forma semejante a lo realizado por Rimmelzwaan y col. en 1991.

Esta prueba ELISA podría incluso desarrollarse sin el empleo de anticuerpos monoclonales específicos, como describen Tuchiya y col. en 1991. En este caso, sería posible utilizar un suero felino hiperinmune anti-VPIF y un suero anti-CVC obtenido en conejo como anticuerpos de captura y detección, respectivamente. Al ser obtenidos en otra especie distinta a la canina, estos sueros únicamente permitirían la detección de partículas de CVC, quedando excluidos otros virus entéricos como PVC, rotavirus, etc.

El método de obtención de suero anti-VPIF es sencillo, y sería posible su empleo sin necesidad de purificación de inmunoglobulinas.

Esta técnica de diagnóstico se caracteriza por su mayor rapidez y sencillez de aplicación en el campo, en comparación con otras pruebas como la ME, el aislamiento en cultivo celular o la inmunofluorescencia directa. Estas técnicas presentan mayores dificultades técnicas de ejecución y un período de tiempo necesario para su realización considerablemente mayor.

Otra línea de trabajo que podemos apuntar consiste en la puesta a punto de una técnica para diferenciar animales vacunados de infectados. Para ello habría que desarrollar un método de radioinmunoprecipitación de proteínas antigénicas, con el fin de distinguir el origen de los anticuerpos detectados en la población. Esta técnica se basa en el hecho de que el suero de animales

infectados inmunoprecipita las proteínas no estructurales del virus, al contrario de lo que sucede con el precedente de perros vacunados con vacunas inactivadas.

Queda aún profundizar en el estudio de la antigenicidad de las proteínas estructurales del CVC. Deberían realizarse un mayor número de ensayos con perros de experimentación y valorarse los distintos isotipos de inmunoglobulinas (IgM, IgG, IgA) inducidos en suero, calostro e intestino de los animales inoculados.

Por último, otro tema de gran interés y con una perspectiva más amplia, es el estudio de la homología antigénica existente entre el CVC aislado y el VGPT. Ello se llevaría a cabo mediante el empleo de una colección de anticuerpos monoclonales capaces de reconocer un mínimo de 25 epítomos. Este análisis permitiría identificar el tipo, el grupo y los epítomos específicos interespecie (Sánchez y col., 1990).

Los resultados obtenidos a partir de toda esta serie de estudios podrían resultar aplicables a otros coronavirus de distintas especies animales, lo cual añade unas nuevas perspectivas de gran interés.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

- 1^a.- Por primera vez en España se pone de manifiesto la presencia del Coronavirus canino y se logra su aislamiento. Ello fue posible únicamente a partir de animales procedentes de una población cerrada (criadero), donde probablemente el virus circularía de forma continuada.
- 2^a.- No existieron diferencias entre la cepa aislada (P-Madrid/90) y la cepa de Coronavirus canino de referencia empleada, cuando se compararon sus perfiles mediante electroforesis e inmunodetección de proteínas.
- 3^a.- Se desarrolló un método inmunoenzimático (experimental) que presentó una sensibilidad y una especificidad adecuadas (80% y 90% respectivamente), habiéndose utilizado la seroneutralización como técnica de referencia.
- 4^a.- Se determinó el grado de acuerdo entre las dos técnicas inmunoenzimáticas utilizadas para detección de anticuerpos (comercial y experimental). La concordancia entre ambas resultó aceptable (valor kappa=0.64).
- 5^a.- El análisis realizado sobre una muestra de sueros con resultados discordantes, empleándose como prueba discriminatoria la inmunodetección, confirmó los resultados obtenidos con el método inmunoenzimático experimental.
- 6^a.- Todo ello permite concluir que el enzimoinmunoensayo desarrollado (experimental) podría utilizarse como una técnica serológica segura y válida para el diagnóstico rutinario de las infecciones por el Coronavirus canino.

- 7ª.- Los resultados obtenidos durante la inmunización experimental con las proteínas N+M y con el virus completo inactivado (cepa P-Madrid/90) fueron semejantes en cuanto a niveles de anticuerpos desarrollados. Sin embargo, los animales inoculados con las proteínas N+M no resultaron protegidos tras la contraprueba.
- 8ª.- Los animales que recibieron la vacuna comercial durante el ensayo de inmunización desarrollaron una escasa respuesta humoral. En contraste, permanecieron protegidos frente a la enfermedad clínica.
- 9ª.- De los resultados de la experimentación animal puede concluirse que el mayor poder inmunogéno correspondió a la glicoproteína S frente al resto de los productos administrados (elevados títulos de anticuerpos y ausencia de signos clínicos tras la contraprueba). Los resultados obtenidos con esta proteína podrían incluirla como candidata para una vacuna de subunidades frente al Coronavirus canino.
- 10ª.- A lo largo de la experimentación animal y mediante la técnica de inmunodetección de proteínas, siempre se observó una reactividad específica frente a cada proteína ensayada en los perros inoculados con cada una de ellas.

VII. BIBLIOGRAFIA

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- ABOU-YOUSSEF, M.H., RISTIC, M. (1972). Distribution of antibodies to transmissible gastroenteritis virus in serum and milk of sows: isolation and identification of the immunoglobulin classes of swine serum and milk. *Am. J. Vet. Res.*, **33**: 975-979.
- 2.- ABOU-YOUSSEF, M.H., RISTIC, M. (1975). Protective effect of immunoglobulins in serum and milk of sows exposed to transmissible gastroenteritis virus. *Can. J. Comp. Med.*, **39**: 41-45.
- 3.- ALMEIDA, J.D., TYRRELL, D.A.J. (1967). The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. *J. Gen. Virol.*, **1**: 175-178.
- 4.- APPEL, M.J.G., COOPER, B.J., GREISEN, H., SCOTT, F., CARMICHAEL, L.E. (1979a). Canine viral enteritis. I. Status report on corona- and parvo-like viral enteritides. *Cornell. Vet.*, **69**: 123-133.
- 5.- APPEL, M.J.G., SCOTT, F.W., CARMICHAEL, L.E. (1979b). Isolation and immunization studies of a canine parvo-like virus from dogs with hemorrhagic enteritis. *Vet. Rec.*, **105**: 156-159.
- 6.- APPEL, M., MEUNIER, P., POLLOCK, R., GREISEN, H., CARMICHAEL, L., GLICKMAN, L. (1980). Canine viral enteritis. A report to practitioners. *Canine Pract.*, **7** (4): 22-36.
- 7.- APPEL, M.J.G. (1987). Canine coronavirus. En: *Virus infections of carnivores*. Elsevier, **1**: 115-122.

- 8.- APPEL, M.J.G. (1988). Does canine coronavirus augment the effects of subsequent parvovirus infection?. *Vet. Med.*, **83**: 360-366.
- 9.- BABIUK, L.A., SABARA, M., HUDSON, G.R. (1985). Rotavirus and coronavirus infections in animals. *Prog. Vet. Microbiol. Immun.*, **1**: 80-120.
- 10.- BECKER, W.B., MCINTOSH, K., DEES, J.H., CHANOCK, R.M. (1967). Morphogenesis of avian infectious bronchitis virus and a related human virus (strain 229E). *J. Virol.*, **1**: 1019-1027.
- 11.- BERNSTEIN, H. (1975). Hemorrhagic gastroenteritis. Current veterinary therapy. WB Saunders Co.: 951.
- 12.- BERTHIAUME, L., ALAIN, R., MCLAUGHLIN, B., PAYMENT, P., TREPANIER, P. (1981). Rapid detection of human viruses in feces by a simple and routine immune electron microscopy technique. *J. Gen. Virol.*, **55**: 223-227.
- 13.- BINN, L.N., LAZAR, E.C., KEENAN, K.P., HUXSOLL, D.L., MARCHWICKI, R.H., STRANO, A.J. (1975). Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. Proc. 78th Meeting, U.S. Animal Health Assoc.: 359-366.
- 14.- BINN, L.N., MARCHWICKI, R.H., STEPHENSON, E.H. (1980). Establishment of a canine cell line. Derivation, characterization, and viral spectrum. *Am. J. Vet. Res.*, **41** (6): 855-860.
- 15.- BINN, L.N., MARCHWICKI, R.H., ECKERMANN, E.H., FRITZ, T.E. (1981). Viral antibody studies of laboratory dogs with diarrheal disease. *Am. J. Vet. Res.*, **42** (10): 1665-1667.

- 16.- BOHL, E.H., GUPTA, R.K.P., McCLOSKEY, L.W., SAIF, L. (1972). Immunology of transmissible gastroenteritis. *J.A.V.M.A.*, **160** (4): 543-549.
- 17.- BOHL, E.H. (1981). Coronaviruses: diagnosis of infections. *Comp. Diag. Virol. Dis.*, **4**: 301-328.
- 18.- BORDIER, C. (1981). Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114. *J. Biol. Chem.*, **256** (4): 1604-1607.
- 19.- BOURSNEILL, M.E., BROWN, T.D., FOULDS, I.J., GREEN, P.F., TOMLEY, F.M., BINNS, M.M. (1987). Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J. Gen. Virol.*, **68**: 57-77.
- 20.- BOYLE, J.F., WEISMILLER, D.G., HOLMES, K.V. (1987). Genetic resistance to mouse hepatitis virus correlates with absence of virus-binding activity on target tissues. *J. Virol.*, **61**: 185-189.
- 21.- BRIAN, D.A., DENNIS, D.E., GUY, J.S. (1980). Genome of porcine transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.*, **34**: 410-415.
- 22.- BUTLER, D.G., GALL, D.G., KELLY, M.H., HAMILTON, J.R. (1974). Transmissible gastroenteritis: mechanisms responsible for diarrhea in acute viral enteritis in piglets. *J. Clin. Invest.*, **53**: 1335-1340.
- 23.- CALLEBAUT, P.E., PENSAERT, M.B. (1980). Characterization and isolation of structural polypeptides in haemagglutinating encephalomyelitis virus. *J. Gen. Virol.*, **48**: 193-204.

- 24.- CALLEBAUT, P.E., CORREA, I., PENSAERT, M., JIMÉNEZ, G., ENJUANES, L. (1988). Antigenic differentiation between transmissible gastroenteritis virus of swine and a related porcine respiratory coronavirus. *J. Gen. Virol.*, **69**: 1725-1730.
- 25.- CARMICHAEL, L.E. (1978). Infectious canine enteritis caused by a coronalike-virus: current status and request for information. *Laboratory Report*, **2** (9).
- 26.- CARMICHAEL, L.E., BINN, L.N. (1981). New enteric viruses in the dog. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, **25**: 1-37.
- 27.- CARMICHAEL, L.E. (1983). Immunization strategies in puppies - Why failures?. *Comp. Cont. Educ. Prac. Vet.*, **5** (12): 1043-1051.
- 28.- CARTWRIGHT, S., LUCAS, M. (1972). Vomiting and diarrhoea in dogs. *Vet. Rec.*, **90**: 571-572.
- 29.- CARTWRIGHT, S. (1973). Small animals: a vomiting and diarrhoea syndrome in dogs. *Vet. Annu.*, **14**: 194-195.
- 30.- CAVANAGH, D., BRIAN, D., ENJUANES, L., HOLMES, K., LAI, M., LAUDE, H., SIDELL, S., SPAAN, W., TAGUCHI, F., TALBOT, P. (1990). Recommendations of the coronavirus study group for the nomenclature of the structural proteins, mRNAs and genes of coronaviruses. *Virology*, **176**: 306-307.
- 31.- CLARK, S.L., Jr. (1959). The ingestion of proteins and colloidal materials by columnar absorptive cells of the small intestine in suckling rats and mice. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **5**: 41-51.

- 32.- COIGNOUL, F., DEWAELE, A. (1979). Canine haemorrhagic enteritis: pathology of a syndrome. *Ann. Méd. Vét.*, **123**: 47-54.
- 33.- COLLINS, A.R., KNOBLER, R.L., POWELL, H., BUCHMEIER, M.J. (1982). Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. *Virology*, **119**: 358-371.
- 34.- CORREA, I., JIMENEZ, G., SUÑE, C., BULLIDO, M.J., ENJUANES, L. (1988). Antigenic structure of the E2 glycoprotein from transmissible gastroenteritis coronavirus. *Virus Research*, **10**: 77-94.
- 35.- CRABBE, P.A., HEREMANS, J.F. (1966). The distribution of immunoglobulin-containing cells along the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, **51**: 305-316.
- 36.- CRANDELL, R.A., FABRICANT, C.G., NELSON-REES, W.A. (1973). Development, characterization and viral susceptibility of a feline (*Felis catus*) renal cell line (CRFK). *In vitro*, **9**: 176-185.
- 37.- CURTIS, J., BOURNE, F.J. (1971). Immunoglobulin quantitation in sow serum, colostrum and milk and the serum of young pigs. *Biochem. et Biophys. Acta*, **236**: 319-332.
- 38.- DALSGAARD, K. (1974). Saponin adjuvants III. Isolation of a substance from *Quillaja saponaria Molina* with adjuvant activity in foot-and-mouth disease vaccines. *Arch. Ges. Virusforsch.*, **44**: 243-254.
- 39.- DAVIS, A.R., NAYAK, D.P., VEDA, M., HITI, A.L., DOWBENKO, D., KLEID, D.G. (1981). Expression of antigenic determinants of the hemagglutinin gene of a human

influenza in *Escherichia coli*. Proc. Natn. Acad. Sci. USA, **78**: 5376-5382.

- 40.- DEA, S., GARZON, S., TIJSSSEN, P. (1989). Isolation and trypsin-enhanced propagation of turkey enteric (bluecomb) coronavirus in a continuous human rectal adenocarcinoma cell line. Am. J. Vet. Res., **50** (8): 1310-1318.
- 41.- DELMAS, B., GELFI, J., LAUDE, H. (1986). Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. II. Domains in the peplomer glycoprotein. J. Gen. Virol., **67**: 1405-1419.
- 42.- DENNIS, D.E., BRIAN, D.A. (1982). RNA-dependent RNA polymerase activity in coronavirus-infected cells. J. Virol., **42**: 153-164.
- 43.- DEREGT, D., SABARA, M., BABIUK, L.A. (1987). Structural proteins of bovine coronavirus and their intracellular processing. J. Gen. Virol., **68**: 2863-2877.
- 44.- DESCOTEAUX, J.P., LUSSIER, G., BERTHIAUME, L., ALAIN, R., SEGUIN, C., TRUDEL, M. (1985). An enteric coronavirus of the rabbit: detection by immunoelectron microscopy and identification of structural polypeptides. Arch. Virol., **84**: 241-250.
- 45.- DOANE, F.W. (1974). Identification of viruses by immunoelectron microscopy. En: Viral immunodiagnosis. Eds: Kurstak, E., Morisset, R. New York, Academic Press: 237-255.
- 46.- DOANE, F.W., ANDERSON, N. (1987). Electron microscopy in diagnostic virology. A practical guide and atlas. Cambridge University Press.

- 47.- DUCATELLE, R., COUSSEMENT, W., PENSAERT, M.B., DEBOUCK, P., HOORENS, J. (1981). "In vivo" morphogenesis of a new porcine enteric coronavirus, CV 777. Arch. Virol., **68**: 35-44.
- 48.- EDSALL, S. (1989). Viral enteritis in Greyhound puppies. Canine Pract., **19** (2): 16-21.
- 49.- EDWARDS, B.G., FULKER, R.H., ACREE, W.M., KOONSE, H.J. (1985). Evaluating a canine coronavirus vaccine through antigen extinction and challenge studies. Vet. Med., **80** (11): 28-33.
- 50.- ENGLAND, J.J., POSTON, R.P. (1980). Electron microscopic identification and subsequent isolation of a rotavirus from a dog with fatal neonatal diarrhea. Am. J. Vet. Res., **41** (5): 782-783.
- 51.- EUGSTER, A.K., SIDWA, T. (1979). Rotaviruses in diarrheic feces of a dog. Vet. Med. Small Anim. Clin., **74**: 817-819.
- 52.- EVERMANN, J.F., FOREYT, W., MAAG-MILLER, L., LEATHERS, C.W., MCKEIRNAN, A.J., LEAMASTER, B. (1980). Acute hemorrhagic enteritis associated with canine coronavirus and parvovirus infections in a captive coyote population. J.A.V.M.A., **177** (9): 784-786.
- 53.- EVERMANN, J.F., MCKEIRNAN, A.J., EUGSTER, A.K., SOLOZANO, R.F., COLLINS, J.K., BLACK, J.W., KIM, J.S. (1989). Update on canine coronavirus infections and interactions with other enteric pathogens of the dog. Canine Pract., **19** (2): 6-11.
- 54.- FIELD, A.M. (1982). Diagnostic virology using electron microscopic techniques. Adv. Virus Res., **27**: 1-55.

- 55.- FISCUS, S.A., TERAMOTO, Y.A., MILDBRAND, M.M., KNISLEY, C.V., WINSTON, S.E., PEDERSEN, N.C. (1985). Competitive enzyme immunoassay for the rapid detection of antibodies to feline infectious peritonitis virus polypeptides. *J. Clin. Microbiol.*, **22**: 395-401.
- 56.- FISCUS, S.A., TERAMOTO, Y.A., (1987). Antigenic comparison of feline coronavirus isolates: evidence for markedly different peplomer glycoproteins. *J. Virol.*, **61** (8): 2607-2613.
- 57.- FLEMING, J.O., STOHLMAN, S.A., HARMON, R.C., LAI, M.M.C., FRELINGER, J.A., WEINER, L.P. (1983). Antigenic relationships of murine coronaviruses: analysis using monoclonal antibodies to JHM (MHV-4) virus. *Virology*, **131**: 296-307.
- 58.- FLEWETT, T.H. (1978). Electron microscopy in the diagnosis of infectious diarrhea. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **173**: 538-543.
- 59.- FRANA, M.F., BEHNKE, J.N., STURMAN, L.S., HOLMES, K.V. (1985). Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: host dependent differences in proteolytic cleavage and cell fusion. *J. Virol.*, **56**: 912-920.
- 60.- FULKER, R.H., EDWARDS, B.G., ACREE, W.M., KOONSE, H. (1986). Safety studies on a killed canine coronavirus vaccine administered simultaneously with modified live canine viral antigen vaccines. *Canine Pract.*, **13** (1): 8-13.
- 61.- GARWES, D.J., POCOCK, D.H. (1975). The polypeptide structure of transmissible gastroenteritis virus. *J. gen. Virol.*, **29**: 25-34.

- 62.- GARWES, D.J., LUCAS, M.H., HIGGINS, D.A., PIKE, B.V., CARTWRIGHT, S.F. (1978/1979). Antigenicity of structural components from porcine transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Microbiol.*, **3**: 179-190.
- 63.- GARWES, D.J. (1980). Structure and physicochemical properties of coronaviruses. *Colloq. Inst. Nat. Sante. Rech. Med.*, **90**: 141-162.
- 64.- GARWES, D.J., REYNOLDS, D.J. (1981). The polypeptide structure of canine coronavirus and its relationship to porcine transmissible gastroenteritis virus. *J. gen. Virol.*, **52**: 153-157.
- 65.- GARWES, D., STEWART, F., CARTWRIGHT, S., BROWN, I. (1988). Differentiation of porcine coronavirus from transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Rec.*, **122**: 86-87.
- 66.- GAUSH, C.R., HARD, W.L., SMITH, T.F. (1969). Characterization of an established line of canine kidney cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **122**: 931-935.
- 67.- GERSHONI, J.M., PALADE, G.E. (1983). Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochem.*, **131**: 1-15.
- 68.- GOUGH, P.M., ELLIS, C.H., FRANK, C.J. (1983a). A viral subunit immunogen for porcine transmissible gastroenteritis. *Antiviral Res.*, **3**: 211-221.
- 69.- GOUGH, P.M., FRANK, C.J., MOORE, D.G. (1983b). Lactogenic immunity to transmissible gastroenteritis virus induced by a subunit immunogen. *Vaccine*, **1**: 37-41.

- 70.- GRAHAM, D.Y., ESTES, M.K., SACKMAN, J.W. (1982). Rotavirus induces an osmotic diarrhea in miniature swine. *Gastroenterology*, **82**: 1072-1079.
- 71.- GREENE, C.E. (1984). Canine viral enteritis. In: *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Ed.: Greene, C.E. Philadelphia, WB Saunders Co.: 437-460.
- 72.- GUPTA, R.K.P. (1971). Serologic response of swine following infection or vaccination with transmissible gastroenteritis virus. Tesis doctoral, Ohio State University, Columbus.
- 73.- HACKETT, J. (1990). **Salmonella**-based vaccines. *Vaccine*, **8**: 5-11.
- 74.- HAELTERMAN, E.O. (1962). Epidemiological studies of transmissible gastroenteritis of swine. Proc. 66th Ann. Meet. U.S. Livestock Sanit. Assoc., **86**: 305-315.
- 75.- HAELTERMAN, E.O. (1965). Lactogenic immunity to transmissible gastroenteritis of swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **147**: 1661-1666.
- 76.- HAMMOND, G.W., HAZELTON, P.R., CHUANG, I., KLISKO, B. (1981). Improved detection of viruses by electron microscopy after direct ultracentrifuge preparation of specimens. *J. Clin. Microb.*, **14**: 210-221.
- 77.- HAMMOND, M.M., TIMONEY, P.J. (1983). An electron microscopic study of viruses associated with canine gastroenteritis. *Cornell Vet.*, **73**: 82-97.

- 78.- HASCHEMEYER, R.H., MYERS, R.J. (1972). Negative staining.
En: Principles and techniques of electron microscopy.
Ed: Hyatt, M.A. New York, Van Nostrand Reinhold. 2:
101-147.
- 79.- HECKERT, R.A., SAIF, L.J., MYERS, G.W. (1991). Mucosal
and systemic isotype-specific antibody responses to
bovine coronavirus structural proteins in naturally
infected dairy calves. Am. J. Vet. Res., 2 (6): 852-
857.
- 80.- HELENIUS, A., SIMONS, K. (1972). The binding of
detergents to lipophilic and hydrophilic proteins. J.
Biol. Chem., 247: 3656-3661.
- 81- HELFER-BAKER, C., EVERMANN, J.F., MCKEIRNAN, A.J.,
MORRISON, W.B. (1980). Serological studies on the
incidence of canine enteritis viruses. Canine Pract.,
7 (3): 37-42.
- 82.- HERBST, V.W., ZHANG, X.M., SCHLIESSER, T. (1988). Zur
seroprävalenz von coronavirusinfektionen beim hund in
der Bundesrepublik Deutschland (Kurzmitteilung). Berl.
Münch. Tierärztl. Wschr., 101: 381-383.
- 83.- HOGUE, B.G., BRIAN, D.A. (1986). Structural proteins of
human respiratory coronavirus OC43. Virus Res., 5:
131-144.
- 84.- HOHDATSU, T., OKADA, S., KOYAMA, H. (1991).
Characterization of monoclonal antibodies against
feline infectious peritonitis virus type II and
antigenic relationship between feline, porcine, and
canine coronavirus. Arch. Virol., 117: 85-95.
- 85.- HOLMES, I.H. (1979). Viral gastroenteritis. Prog. Med.
Virol., 25: 1-36.

- 86.- HOLMES, K.V., BINN, L.N., BEHNKE, J.N., MARCHWICKI, R.H. (1980). Abstr., 80th Annu. Meet., Am. Soc. Microbiol.: 251.
- 87.- HOLMES, K.V., DOLLER, E.W., BEHNKE, J.N. (1981). Analysis of the functions of coronavirus glycoproteins by differential inhibition of synthesis with tunicamycin. Adv. Exp. Med. Biol., **142**: 133-142.
- 88.- HOLMES, K.V., FRANA, M.F., ROBBINS, S.G., STURMAN, L.S. (1984). Coronavirus maturation. Adv. Exp. Med. Biol., **173**: 37-52.
- 89.- HOLMES, K.V. (1985). Replication of coronaviruses. Virology, **57**: 1331-1343.
- 90.- HOLMES, K.V., WELSH, R.M., HASPEL, M.V. (1986). Natural cytotoxicity against mouse hepatitis virus-infected target cells. I. Correlation of cytotoxicity with virus binding to leukocytes. J. Immunol., **136**: 1446-1453.
- 91.- HOLMES, K.V. (1990). Coronaviridae and their replication. En: Virology, 2^a ed. Eds: Fields, B.N., Knipe, D.M. Raven Press Ltd., Nueva York.
- 92.- HOOPER, B.E., HAELTERMAN, E.O. (1969). Lesions of the gastrointestinal tract of pigs infected with transmissible gastroenteritis virus. Canad. J. comp. Med., **33**: 29-36.
- 93- HORZINEK, M.C., LUTZ, H., PEDERSEN, N.C. (1982). Antigenic relationships among homologous structural polypeptides of porcine, feline and canine coronavirus. Infect. Immun., **37**: 1148-1155.

- 94.- HOSHINO, Y., SCOTT, F.W. (1980). Coronavirus-like particles in the feces of normal cats. *Arch. Virol.*, **63**: 147-152.
- 95.- HU, S., BRUSZEWSKI, J., BOONE, T., SOUZA, L. (1984). Cloning and expression of the surface glycoprotein gp195 of porcine transmissible gastroenteritis virus. En: *Modern approaches to vaccines*. Eds: Chanock, R.M., Lerner, R.A. New York, Cold Spring Harbor Laboratory: 219-223.
- 96.- INGERSOLL, J.D., WYLIE, D.E. (1988). Comparison of serologic assays for measurement of antibody response to coronavirus in cats. *Am. J. Vet. Res.*, **49** (9): 1472-1479.
- 97.- JACOBS, L., VAN DER ZEIJST, B.A.M., HORZINEK, M. (1986). Characterization and traslation of transmissible gastroenteritis virus mRNAs. *J. Virol.*, **57**: 1010-1015.
- 98.- JENSEN, M.T., KEMENY, L.T., STONE, S.S., RITCHIE, A.E. (1980). Direct immunoelectron microscopy of TGEV with immunoglobulins G and A and guinea pigs complement. *Am. J. Vet. Res.*, **41**: 136-139.
- 99.- JIMENEZ, G., CORREA, I., MELGOSA, M.P., BULLIDO, M.J., ENJUANES, L. (1986). Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *J. Virol.*, **60**: 131-139.
- 100.- JOHNSON, R.H., SPRADBROW, P.B. (1979). Isolation from dogs with severe enteritis of a parvovirus related to feline panleukopenia virus. *Aust. Vet. J.*, **55**: 151.
- 101.- KAPIKIAN, A.Z., FEINSTONE, S.M., PURCELL, R.H., WYATT, R.G., THORNHILL, T.S., KALICA, A.R., CHANOCK, R.M. (1975). Detection and identification by immune

electron microscopy of fastidious agents associated with respiratory illness, acute non-bacterial gastroenteritis and hepatitis A. *Persp. Virol.*, **9**: 9-45.

- 102.- KAPIKIAN, A.Z. (1977). The Coronaviruses. Chemoprophylaxis and virus infections of the respiratory tract. CRS Press: 96-117.
- 103.- KEENAN, K.P., JERVIS, H.R., MARCHWICKI, R.H., BINN, L.N. (1976). Intestinal infection of neonatal dogs with canine coronavirus 1-71: studies by virologic, histologic, histochemical, and immunofluorescent techniques. *Am. J. Vet. Res.*, **37** (3): 247-256.
- 104.- KERZNER, B., KELLY, M.H., GALL, D.G., BUTLER, D.G., HAMILTON, J.R. (1977). Transmissible gastroenteritis: sodium transport and the intestinal epithelium during the course of viral enteritis. *Gastroenterology*, **72**: 457-462.
- 105.- KIMMAN, T.G. (1992). Risk connected with the use of conventional and genetically engineered vaccines. *Vet. Quart.*, **15**: 110-118.
- 106.- KOJIMA, A., TAKADA, H., OKANIWA, A. (1986). Multiplication of canine coronavirus in CRFK cells. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **48** (6): 1063-1070.
- 107.- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, **227**: 680-685.
- 108.- LAI, M.M.C., PATTON, C.D., STOHLMAN, S.A. (1982). Replication of MHV: negative-stranded RNA and replicative form RNA are of genome length. *J. Virol.*, **44**: 487-492.

- 109.- LAI, M.M.C., STOHLMAN, S. (1987). Coronaviruses: a group with unique features. *Virus Res.*, **7**: 99-102.
- 110.- LARSON, D.J., MOREHOUSE, L.G., SOLORZANO, R.F., KINDEN, D.A. (1979). Transmissible gastroenteritis in neonatal dogs: experimental intestinal infection with transmissible gastroenteritis virus. *Am. J. Vet. Res.*, **40** (4): 477-486.
- 111.- LAVIADA, M.D., DE DIEGO, M., ESCRIBANO, J.M. (1991). Proteins specified by swine transmissible gastroenteritis virus: identification of non-structural proteins by two-dimensional electrophoresis. *Microbiología SEM*, **7**: 90-97.
- 112.- LERNER, R.A. (1983). Synthetic vaccines. *Scient. Am.*, **248**: 66-84.
- 113.- LEWIS, L.D., PHILIPS, R.W. (1972). Water and electrolyte losses in neonatal calves with acute diarrhea - a complete balance study. *Cornell Vet.*, **62**: 596-607.
- 114.- LEWIS, L.D., PHILIPS, R.M., ELLIOTT, E.D. (1975). Changes in plasma glucose and lactate concentrations and enzyme activities in the neonatal calf with diarrhea. *Am. J. Vet. Res.*, **36**: 413-416.
- 115.- LEWIS, L.D., PHILIPS, R.W. (1978). Pathophysiological changes due to coronavirus-induced diarrhea in the calf. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **173**: 636-642.
- 116.- LOPEZ DE TURISO, J.A., CORTES, E., MARTINEZ, C., RUIZ DE YBAÑEZ, R., SIMARRO, I., VELA, C., CASAL, I. (1991). Recombinant vaccine for canine parvovirus in dogs. *J. Virol.*, **66** (5): 2748-2753.

- 117.- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, M.J., FARR, A.R., RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Foline phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- 118.- MADELEY, C.R. (1979). Viruses in the stools. *J. Clin. Path.*, **32**: 1-10.
- 119.- MAKINO, S., REYNOLDS, J.A., TANFORD, C. (1973). The binding of deoxycholate and tritium X-100 to proteins. *J. Biol. Chem.*, **218**: 4926-4932.
- 120.- MARCOTEGUI, M.A. (1987). Diagnóstico de las diarreas víricas de los terneros. En: *Diarreas víricas de los terneros*. Ed.: Solana, A. Bovis, **19**: 35-45.
- 121.- MARSHALL, R.G., FRANK, G.H. (1975). Clinical and immunological responses of calves with colostrally acquired maternal antibody against parainfluenza-3 virus to homologous viral infection. *Am. J. Vet. Res.*, **36**: 1085-1090.
- 122.- MARSHALL, J.A., HEALEY, D.S., STUDDER, M.J., SCOTT, P.C., KENNETT, M.L., WARD, B.K., GUST, I.D. (1984). Viruses and virus-like particles in the faeces of dogs with and without diarrhoea. *Aust. Vet. J.*, **61** (2): 33-38.
- 123.- MARTIN, M.L. (1985). Canine coronavirus enteritis and a recent outbreak following modified live virus vaccination. *Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.*, **7**: 1012-1017.
- 124.- MARTIN CALVO, M., MARCOTEGUI, M.A., SANTURDE, G., MIRO, G., SIMARRO, I. (1992). Datos preliminares sobre coronavirus canino en España. *Med. Vet.*, **9** (3): 157-160.

- 125.- MASSALSKI, A., COULTER-MACKIE, M., KNOBLER, R.L., BUCHMEIER, M.J., DALES, S. (1982). "In vivo" and "in vitro" models of demyelinating diseases. V. Comparison of the assembly of mouse hepatitis virus, strain JHM, in two murine cell lines. *Intervirology*, **18**: 135-146.
- 126.- MATSUBARA, T., (1988). The studies on feline infectious peritonitis inoculated with FIP virus, transmissible gastroenteritis virus and canine coronavirus in cats. *Bull. Nippon Vet. Zotech. Coll.*, **37**: 39-45.
- 127.- McCLURKIN, A.W., STARK, S.L., NORMAN, J.O. (1970). Transmissible gastroenteritis of swine: the possible role of dogs in the epizootiology of transmissible gastroenteritis. *Canad. J. Comp. Med.*, **34**: 347-349.
- 128.- McFERRAN, J.B., McNULTY, M.S., CURRAN, W.L. (1978). Diagnosis of avian viral diseases by electron microscopy. *Am. J. Vet. Res.*, **39**: 505-508.
- 129.- MCGHEE, A., MESTECKY, J., DERTZBAUGH, M.T., ELDRIDGE, J.H., HIRASAWA, M., KIYONO, H. (1992). The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine*, **10**: 75-88.
- 130.- McINTOSH, K. (1974). Coronaviruses: a comparative review. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **63**: 86-129.
- 131.- McNAUGHTON, M.R. (1982). Structural and antigen relationships between human, murine and avian coronaviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **142**: 19-28.
- 132.- McNULTY, M.S., CURRAN, W.L., McFERRAN, J.B., COLLINS, D.S. (1980). Viruses and diarrhoea in dogs. *Vet. Rec.*, **106**: 350-351.

- 133.- MEBUS, C.A., STAIR, E.L., RHODES, M.B., TWIEHAUS, M.J. (1973). Neonatal calf diarrhea: propagation, attenuation, and characteristics of a coronavirus-like agent., **34**: 145-150.
- 134.- MILLER, T.A. (1971). Vaccination against the canine hookworm diseases. *Adv. Parasit.*, **9**: 153-183.
- 135.- MILLER, J.M., EVERMANN, J.F., OTT, R.L. (1980). Immunofluorescence test for canine coronavirus and parvovirus. *West. Vet.*, **18**: 14-19.
- 136.- MOCHIZUKI, M., SUGIURA, R., AKUZAWA, M. (1987). Micro-neutralization test with canine coronavirus for detection of coronavirus antibodies in dogs and cats. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **49** (3): 563-565.
- 137.- MONROE, J.H., BRANDT, P.M. (1970). Rapid semiquantitative method for screening large numbers of virus samples by negative staining electron microscopy. *Appl. Microbiol.*, **20** (2): 259-262.
- 138.- MOON, H.W. (1972). Vacuolated villous epithelium of the small intestine of young pigs. *Vet. Pathol.*, **9**: 3-21.
- 139.- MOON, H.W. (1978). Mechanisms in the pathogenesis of diarrhea: a review. *J.A.V.M.A.*, **172**: 443-448.
- 140.- NELSON-REES, W.A., OWENS, R.B., ARNSTEIN, P. (1976). Source, alterations, characteristics and use of a new dog cell line (Cf₂Th). *In vitro*, **12**: 665-669.
- 141.- NERMUT, M.V. (1972). Negative staining of viruses. *J. Micros.*, **96**: 351-362.

- 142.- NIEMANN, H., KLENK, H.D. (1981). Coronavirus glycoprotein E1, a new type of viral glycoprotein. *J. Mol. Biol.*, **153**: 993-1010.
- 143.- NORMAN, J.O., McCLURKIN, A.W., STARK, S.L. (1970). Transmissible gastroenteritis of swine: canine serum antibodies against an associated virus. *Can. J. Comp.Med.*, **34**: 115-117.
- 144.- OSHIRO, L.S., SCHIEBLE, J.H., LENNETTE, E.H. (1971). Electron microscopic studies of coronavirus. *J. gen. Virol.*, **12**: 161-168.
- 145.- OSHIRO, L.S. (1973). Coronaviruses. En: *Ultrastructure of animal viruses and bacteriophages: an atlas*. Eds: Dalton A.J., Haguenau, F. Orlando, Academic Press: 331-343.
- 146.- OSTERHAUS, A.D.M.E., DROST, G.A., WIRAHADIREDDJA, R.M.S., VAN DEN INGH, S.G.A.M. (1980). Canine viral enteritis: prevalence of parvo-, corona- and rotavirus infections in dogs in the Netherlands. *Vet. Quart.*, **2** (4): 182-189.
- 147.- PASTORET, P.P., SCHWERS, A., BURTONBOY, G., COIGNOUL, F. (1980). Les diarrhées d'origine virale chez le chien. *Ann. Méd. Vet.*, **124**: 89-101.
- 148.- PEDERSEN, N.C., WARD, J., MENGELING, W.L. (1978). Antigenic relationship of the feline infectious peritonitis virus to coronavirus of other species. *Arch. Virol.*, **58**: 45-53.
- 149.- PEDERSEN, N.C., BOYLE, J.F., FLOYD, K., FUDGE, A., BARKER, J. (1980). An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. *Am. J. Vet. Res.*, **42** (3): 368-377.

- 150- PENSAERT, M., CALLEBAUT, P. (1978). The coronaviruses: Clinical and estructural aspects with some practical implications. *Ann. Méd. Vet.*, **122**: 301-322.
- 151.- PENSAERT, M., CALLEBAUT, P., VERGOTE, J. (1986). Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. *Vet. Quart.*, **8**: 257-260.
- 152.- POLLOCK, R.V.H., CARMICHAEL, L.E. (1979). Canine viral enteritis: recent developments. *Mod. Vet. Prac.*, **60**: 375-380.
- 153.- POLLOCK, R.V.H. (1983). Enteric infections: canine viral enteritis. En: *Current Veterinary Therapy VIII. Small Animal Practice*. WB Saunders Co.: 1164-1168.
- 154.- POLLOCK, R.V.H., CARMICHAEL, L.E. (1990). Canine viral enteritis. En: *Infectious diseases of the dog and cat*. Ed.: Greene, C.E. WB Saunders Co.: 268-287.
- 155.- POST, J.E., WELLENSTEIN, R.C., CLARK, R.D. (1978). Serological tests for feline infectious peritonitis using TGE virus antigen. *Amer. Assn. Vet. Lab. Diag. 21st Annual Proceedings*: 427-436.
- 156.- RESTA, S., LUBY, J.P., ROSENFELD, C.R., SIEGEL, J.D. (1985). Isolation and propagation of a human enteric coronavirus. *Science*, **229**: 978-981.
- 157.- REYNOLDS, D.J., GARWES, D.J. (1977). Virus isolation and serum antibody responses after infection of cats with transmissible gastroenteritis virus. *Arch. Virol.*, **55**: 77-86.

- 158.- REYNOLDS, D.J., GARWES, D.J., LUCEY, S. (1980). Differentiation of canine coronavirus and porcine transmissible gastroenteritis virus by neutralization with canine, porcine and feline sera. *Vet. Microbiol.*, **5**: 283-290.
- 159.- RIMMELZWAAN, G.F., GROEN, J., EGBERINK, H., BORST, G.H.A., UYTDEHAAG, F.G.C.M., OSTERHAUS, A.D.M.E. (1991). 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.*, **26**: 25-40.
- 160.- ROSETO, A., LEMA, F., CAVALIERI, F., DIANOUX, L., SITBON, M., FERCHAL, F., LASNERET, J., PERIES, J. (1980). Electron microscopy detection and characterization of viral particles in dog stools. *Arch. Virol.*, **66**: 89-93.
- 161.- RUBIO, P. (1988). Prevalencia de las infecciones por rotavirus y por el virus de la gastroenteritis porcina transmisible en el cerdo en Castilla y León y aportaciones al conocimiento de la epizootiología de las infecciones por rotavirus en lechones. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de León (España).
- 162.- SAIF, L.J., SMITH, K.L. (1985). Enteric viral infections of calves and passive immunity. *J. Dairy Sci.*, **68**: 206-228.
- 163.- SANCHEZ, C.M., JIMENEZ, G., LAVIADA, M.D., CORREA, I., SUÑE, C., BULLIDO, M.J., GEBAUER, F., SMERDOU, C., CALLEBAUT, P., ESCRIBANO, J.M., ENJUANES, L. (1990). Antigenic homology among coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus. *Virology*, **174**: 410-417.

- 164.- SCHNAGL, R.D., HOLMES, I.H. (1978). Coronavirus-like particles in stools from dogs, from some country areas of Australia. *Vet. Rec.*, **102**: 528-529.
- 165.- SIDDELL, S.G., ANDERSON, R., CAVANAGH, D., FUGIWARA, K., KLENK, H.D., McNAUGHTON, M.R., PENSAERT, M., STOHLMAN, S.A., STURMAN, L., VAN DER ZEIJST, B.A.M. (1983). Coronaviridae. *Intervirology*, **20**: 181-189.
- 166.- SOLORZANO, R.F., MORIN, M. (1978). The use of immunofluorescence technique for the laboratory diagnosis of transmissible gastroenteritis of swine. *Canad. J. Comp. Med.*, **42**: 385-391.
- 167.- SOULSBY, E.J.L. (1987). *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. (7ª Edición). Ed. Interamericana.
- 168.- SPAAN, W., CAVANAGH, D., HORZINEK, M.C. (1988). Coronaviruses: structure and genome expression. *J. gen. Virol.*, **69**: 2939-2952.
- 169.- SPAAN, W., VENNEMA, H., DE GROOT, R., DALDERUP, M., HORZINEK, M.C., HARBOUR, D., GRUFFYDD-JONES, T. (1989). Early death after challenge with feline infectious peritonitis virus of kittens immunized with a recombinant vaccinia virus expressing the FIPV spike protein. En: *Vaccines 89. Modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS*. Eds: Lerner, R.A., Ginsberg, R.M., Brown, F. Cold Spring Harbor Laboratory, New York: 491-495.
- 170.- STODDART, C.A., BARLOUGH, J.E., BALDWIN, C.A., SCOTT, F.W. (1988). Attempted immunisation of cats against feline infectious peritonitis virus using canine coronavirus. *Res. Vet. Sci.*, **45**: 383-388.

- 171.- STONE, S.S., HESS, W.R. (1967). Antibody response to inactivated preparations of African Swine Fever Virus in pigs. *Am. J. Vet. Res.*, **28** (123): 475-481.
- 172.- STORZ, J., ROTT, R., KALUZA, G. (1981). Enhancement of plaque formation and cell fusion of an enteropathogenic coronavirus by trypsin treatment. *Infect. Immun.*, **31**: 1214-1222.
- 173.- STURMAN, L.S., HOLMES, K.V. (1983). The molecular biology of coronaviruses. *Adv. V. Res.*, **28**: 35-112.
- 174.- STURMAN, L.S., RICARD, C.S., HOLMES, K.V. (1985). Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of two different 90K cleavage fragments. *J. Virol.*, **56**: 904-911.
- 175.- SVENSSON, L., GRANDIEN, M., PETTERSSON, C.A. (1983). Comparison of solid-phase immune electron microscopy by use of protein A with direct electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of rotavirus in stool. *J. Clin. Microbiol.*, **18**: 1244-1249.
- 176.- TAJIMA, M. (1970). Morphology of transmissible gastroenteritis virus of pigs. *Arch. ges. Virusforsch.*, **29**: 105-108.
- 177.- TAKACS, B. (1979). Electrophoresis of proteins in polyacrilamide slab gels. *Immunological Methods*. Acad. Press Ed.: 81-105
- 178.- TAKEUCHI, A., BINN, L.N., JERVIS, H.R., KEENAN, K.P., HILDERBRANDT, P.K., VALAS, R.B., BLAND, F.F. (1976). Electron microscope study of experimental enteric infection in neonatal dogs with a canine coronavirus.

Lab. Invest., **34** (6): 539-549.

- 179.- TALBOT, P.J., SALMI, A.A. KNOBLER, R.L., BUCHMEIER, M.J. (1984). Topographical mapping of epitopes on the glycoproteins of murine hepatitis virus-4 (strain JHM): correlation with biological activities. *Virology*, **132**: 250-260.
- 180.- TALBOT, P.J., BUCHMEIER, M.J. (1985). Antigenic variation among murine coronaviruses: evidence for polymorphism on the peplomer glycoprotein, E2. *Virus Res.*, **2**: 317-328.
- 181.- TENNANT, B.J., GASKELL, R.M., KELLY, D.F., CARTER, S.D. (1991a). Canine coronavirus infection in the dog following oronasal inoculation. *Res. Vet. Sci.*, **51**: 11-18.
- 182.- TENNANT, B.J., GASKELL, R.M., JONES, R.C., GASKELL, C.J. (1991b). Prevalence of antibodies to four major canine viral diseases in dogs in a Liverpool hospital population. *J. Small Animal Practice*, **32**: 175-179.
- 183.- THERY, S. (1980). Contribution a l'etude epidemiologique de la coronavirose du chien en region parisienne. (Tesis doctoral). Ecole Nationale Vétérinaire D'Alfort (Francia).
- 184.- THOMPSON, G.W., GAGNON, A.N. (1978). Canine gastroenteritis associated with a parvovirus-like agent. *Can. Vet. J.*, **19**: 346.
- 185.- TINGPALAPONG, M., WHITMIRE, R.E., WATTS, D.M., BURKE, D.S., BINN, L.N., TESAPRATEEP, T., LAUNGTONGKUM, S. (1981). Epizootic of viral enteritis in dogs in Thailand. *Am. J. Vet. Res.*, **43** (9): 1687-1690.

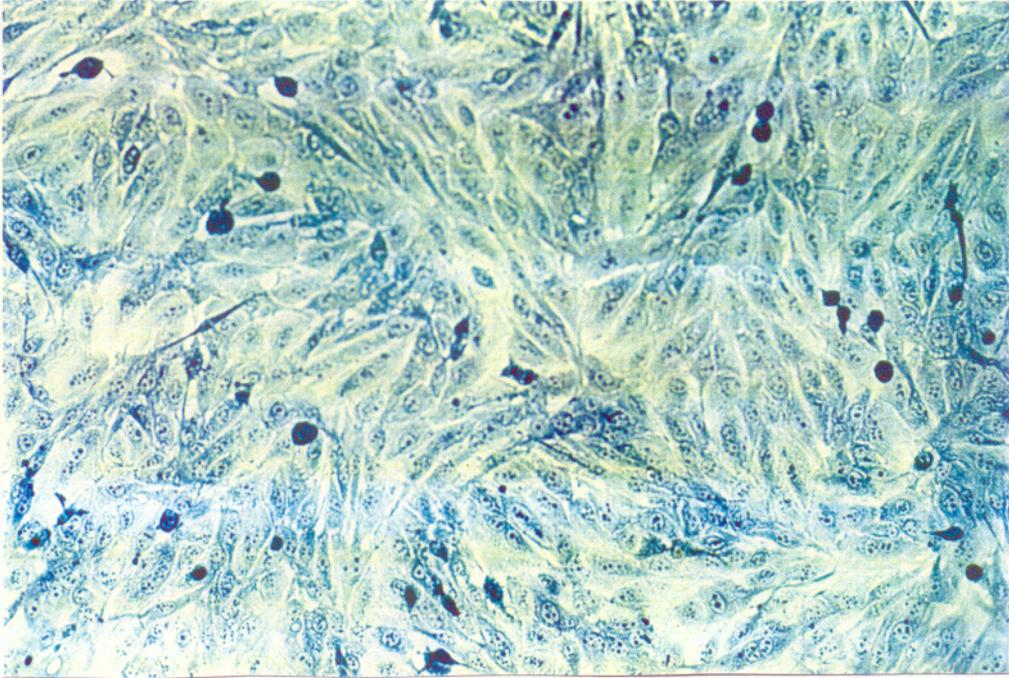
- 186.- TOMA, B., VANNIER, P., AYNAUD, J. (1978). Enquête épidémiologique sur la gastroentérite transmissible du porc in France. *Rec. Méd. Vét.*, **154**: 853-858.
- 187.- TOMA, B., MORAILLON, A. (1980). Infection du chien par un virus antigéniquement apparenté au virus de la gastro-entérite transmissible du porc. *Rec. Méd. Vét.*, **156** (6): 464-470.
- 188.- TOMA, B., CHAPPUIS, G., ELOIT, M. (1982). Recherche des anticorps du parvovirus et du coronavirus canins chez l'homme. *Rec. Méd. Vét.*, **158** (7-8): 607-610.
- 189.- TOMASI, T.B. JR., BIENENSTOCK, J. (1968). Secretary immunoglobulins. *Adv. Immunol.*, **9**: 1-96.
- 190.- TOOZE, J., TOOZE, S., WARREN, G. (1984). Replication of coronavirus MHV-A59 in sac-cells: determination of the first site of budding of progeny virions. *Eur. J. Cell Biol.*, **33**: 281-293.
- 191.- TOOZE, J., TOOZE, S.A. (1985). Infection of AtT20 murine pituitary tumor cells by mouse hepatitis virus strain A59: virus budding is restricted to the Golgi region. *Eur. J. Cell. Biol.*, **37**: 203-212.
- 192.- TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 4350-4354.
- 193.- TUCHIYA, K., KASAOKA, T., AZETAKA, M., TAKAHASHI, E., KONISHI, S. (1987). Plaque assay for canine coronavirus in CRFK cells. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **49** (3): 571-573.

- 194.- TUCHIYA, K., HORIMOTO, T., AZETAKA, M., TAKAHASHI, E., KONISHI, S. (1991). Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine coronavirus and its antibody in dogs. *Vet. Microbiol.*, **26**: 41-51.
- 195.- TURNER, J.L. (1989). Canine coronavirus. *Can. Pract.*, **19** (2): 13-15.
- 196.- TYRRELL, D.A.J., ALMEIDA, J.D., BERRY, D.M., CUNNINGHAM, C.H., HAMRE, D., HOFSTAD, M.S., MALLUCCI, L., MCINTOSH, K. (1968). Coronaviruses. *Nature (London)*, **220**: 650.
- 197.- TYRRELL, D.A.J., ALMEIDA, J.D., CUNNINGHAM, C.H., DOWDLE, W.R., HOFSTAD, M.S., MCINTOSH, K., TAJIMA, M., ZAKSTELSKAYA, L.YA., EASTERDAY, B.C., KAPIKIAN, A., BINGHAM, R.W. (1975). Coronaviridae. *Intervirology*, **5**: 76.
- 198.- TYRRELL, D.A.J., KAPIKIAN, A. (1982). Coronaviruses in animals: Virus infections of the gastrointestinal tract. Dekker, New York: 315-359.
- 199.- VANDENBERGHE, J., DUCATELLE, R., DEBOUCK, P., HOORENS, J. (1980). Coronavirus infection in a litter of pups. *Vet. Quart.*, **2** (3): 136-141.
- 200.- VAN ZAANE, D., IJZERMAN, J., DE LEEUW, P.W. (1986). Intestinal antibody response after vaccination and infection with rotavirus of calves fed colostrum with or without rotavirus antibody. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **11**: 45-63.
- 201.- VLASAK, R., LUYTJES, W., LEIDER, J., SPAAN, W., PALESE, P. (1988). The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor -destroying enzyme with acetylerase activity. *J. Virol.*, **62**: 4686-4690.

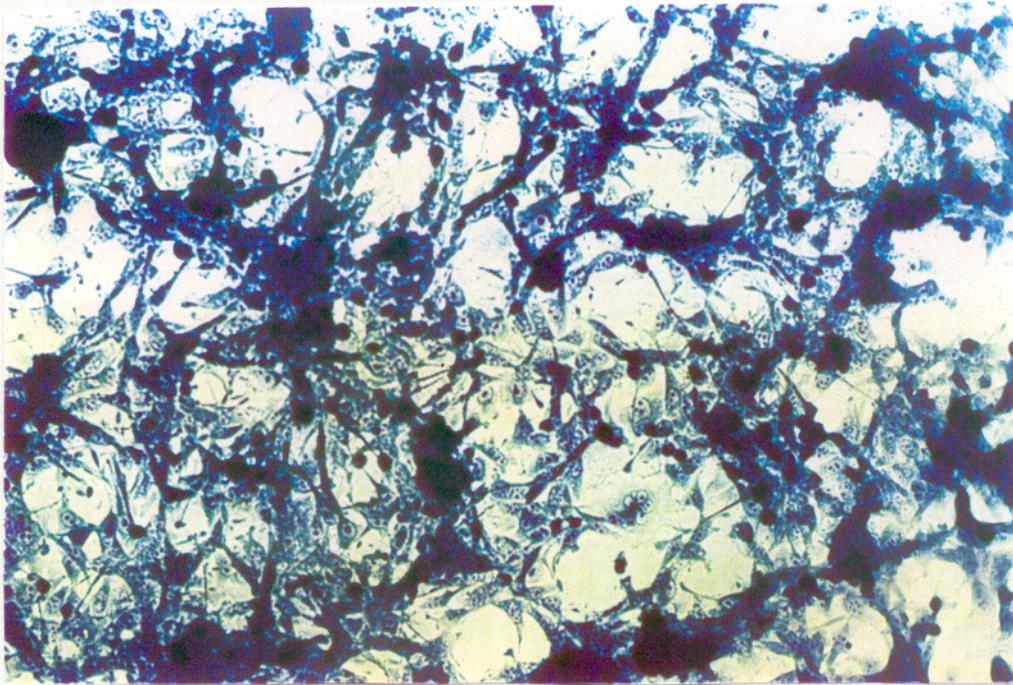
- 202.- WAGNER, J.E., BEAMER, P.D., RISTIC, M. (1973). Electron microscopy of intestinal epithelial cells of piglets infected with a transmissible gastroenteritis virus. *Can. J. Comp. Med.*, **37**: 177-186.
- 203.- WEGE, H., SIDDELL, S., TER MEULEN, V. (1982). The biology and pathogenesis of coronaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **99**: 165-200.
- 204.- WELLIVER, R.C., OGRA, P.L. (1978). Importance of local immunity in enteric infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **173**: 560-564.
- 205.- WESLEY, R.D., CHEUNG, A.K., MICHAEL, D.D., WOODS, R.D. (1989). Nucleotide sequence of coronavirus TGEV genomic RNA: evidence for 3 mRNA species between the peplomer and matrix protein genes. *Virus Research*, **13**: 87-100.
- 206.- WESLEY, R., WOODS, R., CHEUNG, A. (1990). Genetic basis for the pathogenesis of transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.*, **64**: 4761-4766.
- 207.- WILLIAMS, F.P. (1980). Astrovirus-like, coronavirus-like, and parvovirus-like particles detected in the diarrheal stools of Beagle pups. *Arch. Virol.*, **66**: 215-226.
- 208.- WOODS, R.D., CHEVILLE, N.F., GALLAGHER, J.E. (1981). Lesions in the small intestine of newborn pigs inoculated with porcine, feline, and canine coronaviruses. *Am. J. Vet. Res.*, **42** (7): 1163-1169.
- 209.- WOODS, R.D. (1982). Studies of enteric coronaviruses in a feline cell line. *Vet. Microbiol.*, **7**: 427-435.

- 210.- WOODS, R.D., WESLEY, R.D. (1986). Immune response in sows given transmissible gastroenteritis virus or canine coronavirus. *Am. J. Vet. Res.*, **47** (6): 1239-1242.
- 211.- WOODS, R., WESLEY, R., KAPKE, P. (1988). Neutralization of porcine transmissible gastroenteritis virus by complement-dependent monoclonal antibodies. *Am. J. Vet. Res.*, **49**: 300-304.
- 212.- YASOSHIMA, A., FUJINAMI, F., DOI, K., KOJIMA, A., TAKADA, H., OKANIWA, A. (1983). Case report on mixed infection of canine parvovirus and canine coronavirus. Electron microscopy and recovery of canine coronavirus. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **45** (2): 217-225.

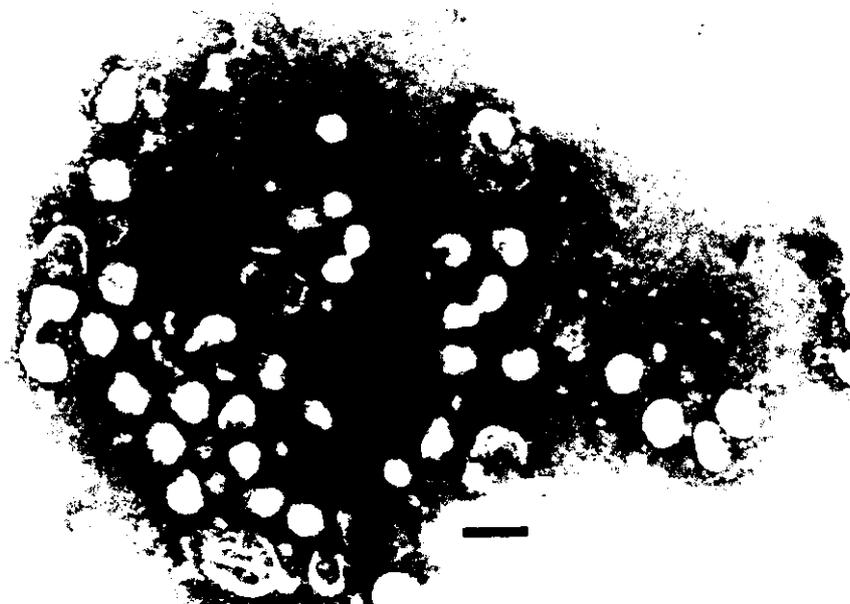
VIII. ICONOGRAFIA



Fotografía 1.- Tapiz celular de la línea A-72 sin infectar. Tinción metacromática basada en el método de May-Grünwald-Giemsa.



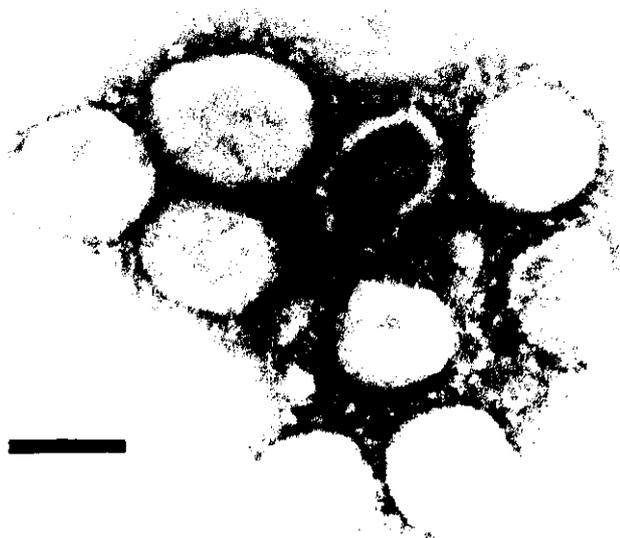
Fotografía 2.- Tapiz celular de la línea A-72 infectada con 1ª cepa aislada P-Madrid/90 (48 hpi). Tinción metacromática basada en el método de May-Grünwald-Giemsa



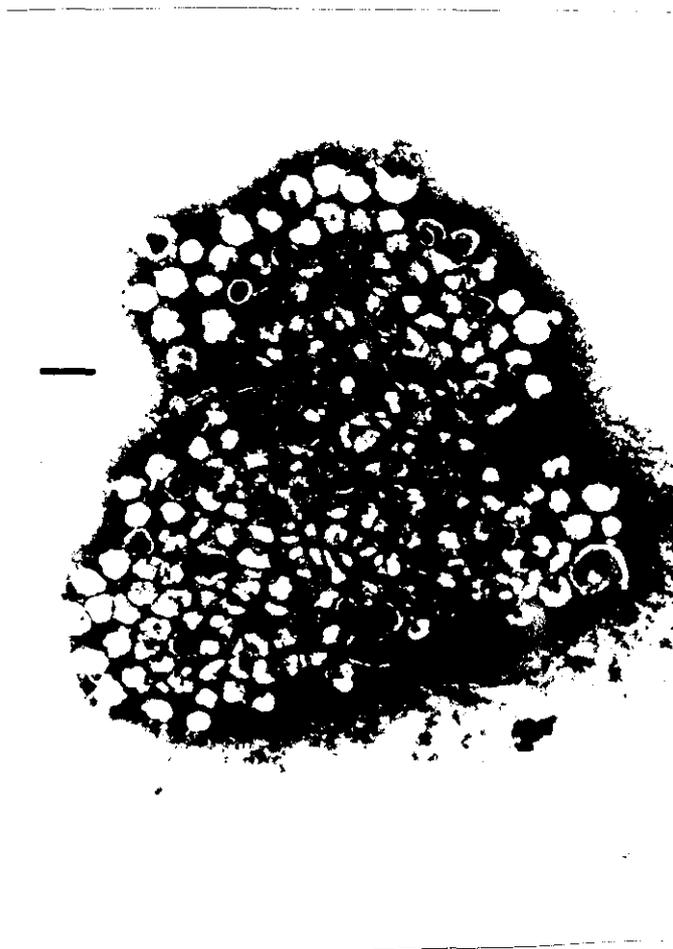
Fotografía 3.- Partículas de coronavirus canino (CVC) en heces. Tinción negativa con ácido fosfotúngstico (PTA) al 2%. La barra representa 100 nm. (X 100.000).



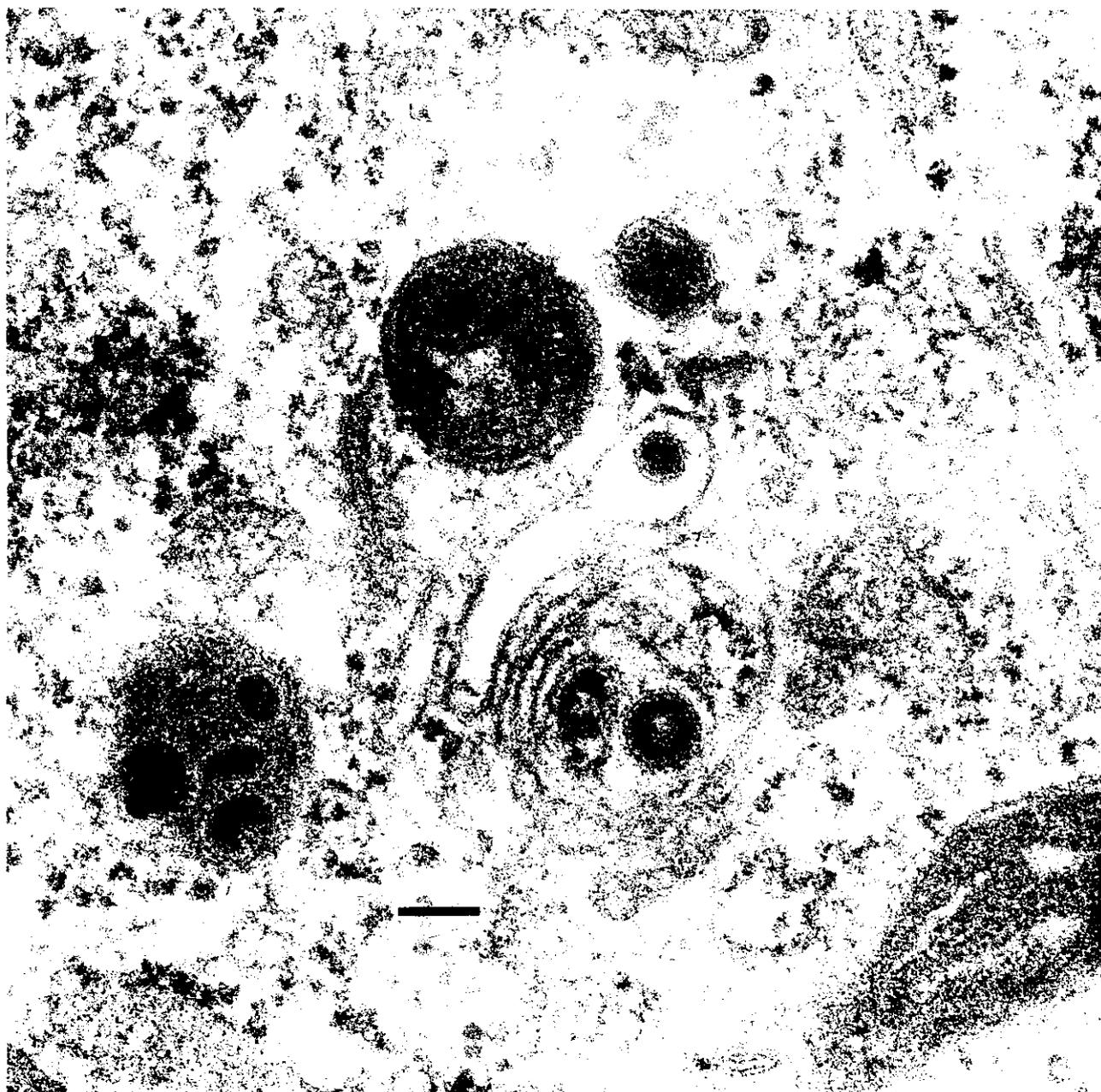
Fotografía 4.- Infección mixta por parvovirus canino y coronavirus (flechas) en heces. Tinción negativa con ácido fosfotúngstico (PTA) al 2%. La barra representa 100 nm. (X 100.000).



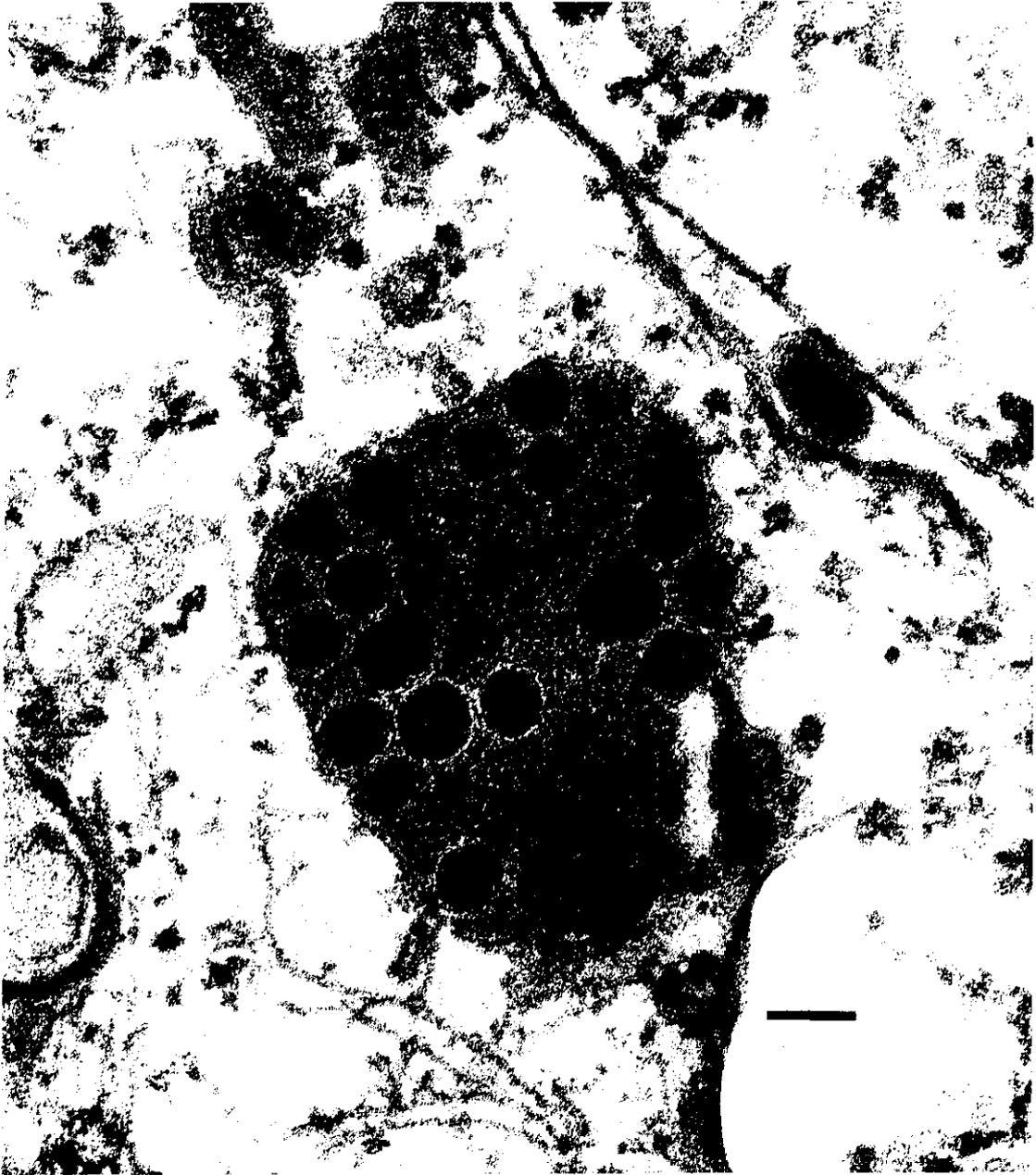
Fotografía 5.- Partículas de CVC en el sobrenadante de un cultivo celular infectado. Tinción negativa (PTA 2%). La barra representa 100 nm. (X 150.000).



Fotografía 6.- Inmunomicroscopia electrónica. Inmunocomplejo resultado de la interacción del CVC y su antisuero específico. Tinción negativa (PTA 2%). La barra representa 100 nm. (X 64.000).



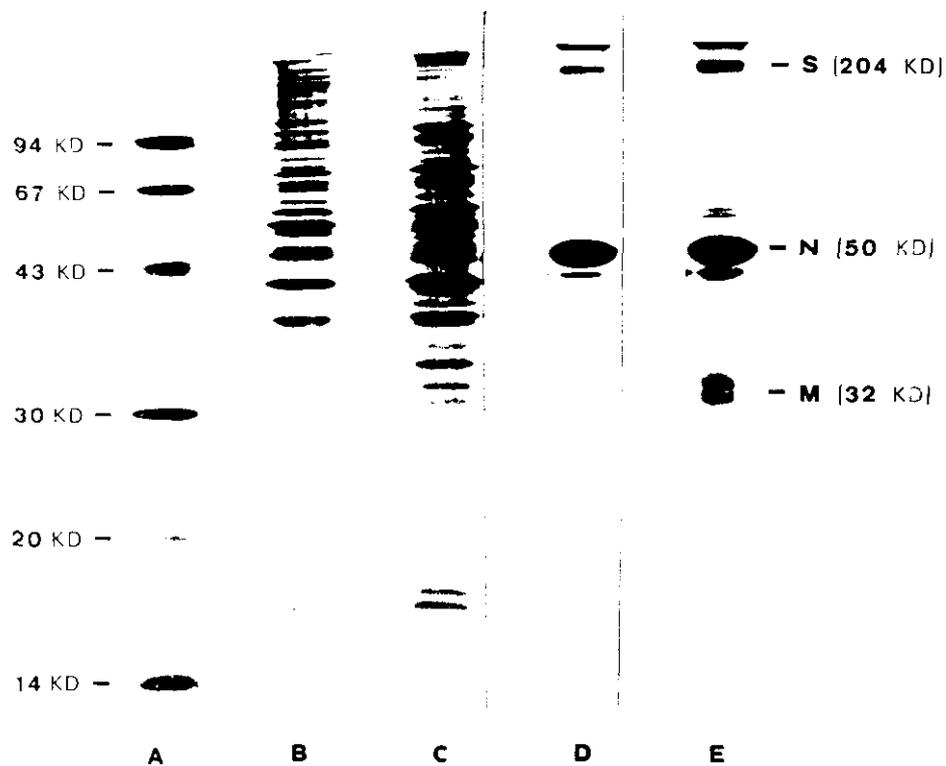
Fotografía 7.- Presencia de viriones en pequeños grupos localizados en la luz del retículo endoplásmico rugoso (RER) y aparato de Golgi (14 hpi). Corte ultramicroscópico. La barra representa 100 nm. (X 128.000).



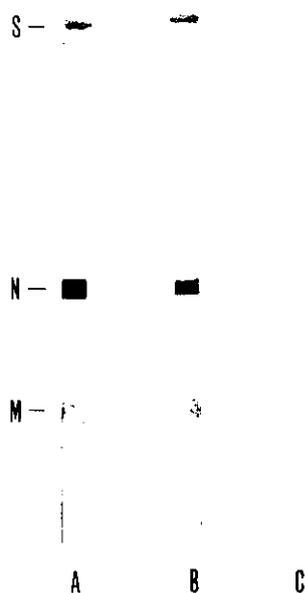
Fotografía 8.- Viriones (flechas) incluidos en vesículas del citoplasma de una célula infectada (24 hpi). Corte ultramicroscópico. La barra representa 100 nm. (X 128.000).



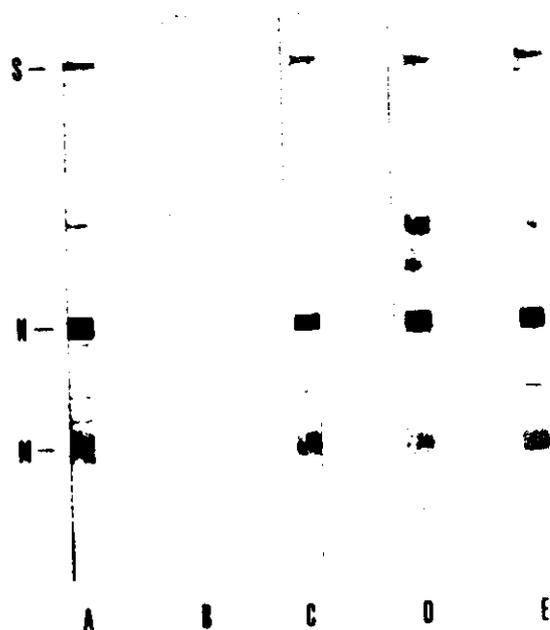
Fotografía 9.- Grandes masas de viriones en el espacio extracelular (48 hpi). Corte ultramicroscópico. (X 10.000).



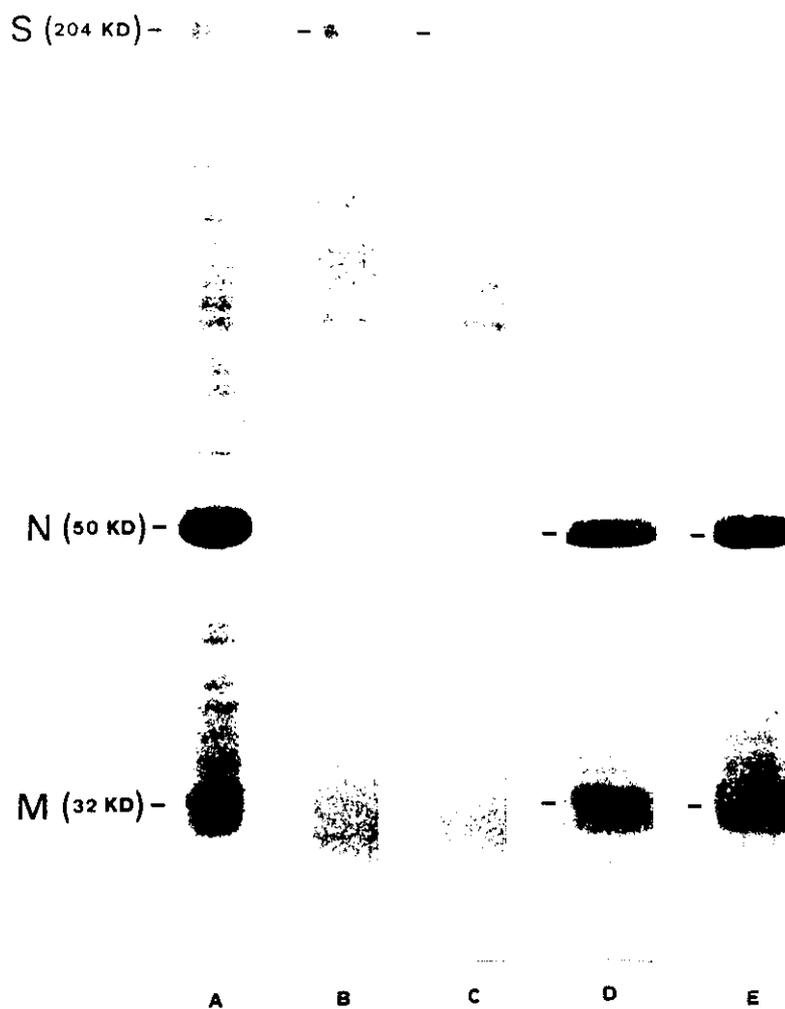
Fotografía 10.- Análisis de las proteínas víricas estructurales del CVC. SDS-PAGE: Patrón comercial de pesos moleculares (A), células A-72 sin infectar (B), células A-72 infectadas con la cepa de virus campo (P-Madrid/90) (C), CVC de referencia s3786/6 (D), aislado P-Madrid/90 (E).



Fotografía 11.- Identificación de la cepa de campo aislada. Inmunodetección de proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa: reacción del suero hiperinmune de referencia con las proteínas del CVC (cepa P-Madrid/90) **(A)** y con las proteínas del CVC de referencia s3786/6 **(B)**. Reacción del suero de referencia negativo con las proteínas del CVC de referencia **(C)**



Fotografía 12.- Especificidad de reacción de algunos sueros de campo frente a la cepa de CVC aislado. Inmunodetección de proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa: suero de referencia positivo (A), suero de referencia negativo (B), sueros positivos de campo (C, D y E).



Fotografía 13.- Patrones electroforéticos de las distintas proteínas estructurales del coronavirus canino (CVC) antes y después del tratamiento con Tritón X-114. SDS-PAGE: CVC completo (cepa P-Madrid/90) (A), glicoproteína S (204 kD) en la fracción acuosa (B y C), proteínas N+M (50 y 32 kD, respectivamente) en la fracción detergente (D y E).