

Disentería de invierno asociada con el coronavirus bovino en vacas de la provincia Mayabeque, Cuba

Winter dysentery associated with bovine coronavirus in cows from Mayabeque province, Cuba



<http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RSA/article/view/1180>

^{id}Maray Curiel Hernández, ^{id}Cristian Díaz Corona, ^{id}Adriana Mesa Delgado, ^{id}Ana María Acevedo Beiras, ^{id}Liani Coronado Báez, ^{id}Yalainne Obret Ferrer, ^{id}Gisselle Chavez Rodriguez, ^{id}Carmen Laura Perera González*

Grupo de Virología Animal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, CP 32 700, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: La disentería de invierno (DI) es una enfermedad altamente contagiosa, caracterizada por desórdenes gastrointestinales en el ganado bovino. El coronavirus bovino (BCoV) se ha reconocido como el agente etiológico de este síndrome. En Cuba, se presentó por primera vez en el ganado adulto en el año 2004, y más tarde entre enero de 2008 y febrero de 2009. En 2020, se presentaron brotes diarreicos con características clínicas y epidemiológicas similares a la DI, en unidades de la provincia Mayabeque. De ocho muestras de heces colectadas, se confirmó en siete de ellas la presencia del BCoV mediante ensayos de reverso transcripción acoplado a reacción en cadena de la polimerasa en punto final (RT-PCR), lo que confirmó 87,5 % de positividad. El virus se aisló en cultivos celulares y se observó el efecto citopático característico de este al quinto día posterior a la inoculación. Los resultados del presente estudio confirmaron que el BCoV es el agente causal de los cuadros diarreicos de los bovinos estudiados y reafirmaron el modo epizootico de presentación de esta enfermedad en el rebaño.

Palabras clave: disentería de invierno, coronavirus bovino, aislamiento, RT-PCR.

ABSTRACT: Winter dysentery (WD) is a highly contagious disease characterized by gastrointestinal disorders in cattle. Bovine coronavirus (BCoV) has been recognized as the etiological agent of this syndrome. In Cuba, it appeared for the first time in adult cattle in 2004, and later between January 2008 and February 2009. In 2020, diarrheal outbreaks with clinical and epidemiological characteristics similar to WD occurred in units from Mayabeque province. Of eight stool samples collected, the presence of BCoV was confirmed in seven of them by reverse transcription assays coupled to end-point polymerase chain reaction (RT-PCR), which confirmed 87.5 % positivity. Virus was isolated in cell cultures and its characteristic cytopathic effect was observed on the fifth day after inoculation. The results of the present study confirmed that BCoV is the causative agent of diarrheas in the bovine herds studied, and confirmed the epizootic mode of presentation of this disease in them.

Key words: winter dysentery, bovine coronavirus, isolation, RT-PCR.

La disentería de invierno (DI) es una enfermedad viral infectocontagiosa aguda, que afecta a los rebaños bovinos, por lo general en los meses más fríos del año (1) y provoca grandes pérdidas económicas en la industria lechera y de la carne en todo el mundo (2). El coronavirus bovino (BCoV) se ha identificado como el principal agente etiológico de este síndrome. Es un virus ARN, de simple cadena, con polaridad positiva (2), nucleocápside helicoidal, envuelto y con un diámetro de aproximadamente 120 nm (1). Debido a la presencia de lípidos esenciales en la envoltura viral, el virus se inactiva rápidamente con solventes orgánicos como éter, cloroformo y deoxicolato de sodio, así como detergentes (3).

El BCoV se ubica taxonómicamente en el orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae*, subfamilia *Orthocoronavirinae*, género *Betacoronavirus* (Coronavirus del grupo 2), subgénero *Embecovirus* (linaje a), especie *Betacoronavirus 1 (2a)* (ICTV: 2020). Se reportó por primera vez en los Estados Unidos, asocia-

do a una enfermedad entérica en terneros neonatos y causó importantes pérdidas en la producción bovina (4,5). Además de infectar el sistema digestivo, BCoV posee un tropismo respiratorio (6). En la década de los noventa Storz *et al.* (7) aislaron el BCoV a partir de secreciones nasales de bovinos jóvenes con signos clínicos de tipo respiratorio.

En la actualidad, el BCoV está ampliamente difundido en el ganado bovino, y se ha identificado como el principal agente causal de la DI en varios países del hemisferio norte (8,9).

La disentería de invierno se manifiesta con severas diarreas líquidas y fétidas, que algunas veces contienen sangre y mucus (10), así como disminución de la producción láctea, que puede ir desde 25 hasta 95 % (11), depresión, anorexia y algunas veces tos y/o descargas nasolagrimalas (12). En algunos casos se observan cólicos leves. Si la diarrea es grave, o persistente por más de un día, podrá ocurrir deshidratación, por lo que la pérdida de peso se hace evidente (13).

*Autor para correspondencia: Carmen Laura Perera González. E-mail: claura@censa.edu.cu

Recibido: 01/10/2021

Aceptado: 20/12/2021

Dos semanas posteriores al inicio de la diarrea, todos los animales se recuperan, aunque en grandes rebaños la duración se puede prolongar de seis a ocho semanas (14).

Las técnicas de diagnóstico más utilizadas para la confirmación de este virus son los ensayos de hemaglutinación y la PCR (3).

En los últimos años, se han descrito varios ensayos de RT-PCR, que utilizan como diana a los genes N y M (15), que detectan el BCoV a partir de muestras de exudado nasal, rectal y heces (16, 17).

En Cuba, el BCoV se identificó por primera vez en el año 2004, en muestras de heces fecales procedentes de vacas lecheras con un cuadro clínico compatible con la DI, que se caracterizó por una elevada morbilidad y baja mortalidad (8). En los años posteriores ocurrieron varios brotes estacionales de DI en el país (9); sin embargo, desde 2008 no se reportaban casos. En septiembre de 2020, un nuevo reporte de DI se realizó en varias granjas de bovinos en la provincia Mayabeque. Los bovinos presentaron cuadros agudos de diarrea con una severa disminución de la producción de leche y una elevada morbilidad.

El objetivo del presente trabajo fue realizar el diagnóstico del BCoV mediante un ensayo RT-PCR en punto final y realizar la confirmación de la presencia del virus por aislamiento viral en cultivos celulares.

Se colectaron ocho muestras de heces de bovinos con cuadro clínico compatible a la DI y se procesaron para realizar el diagnóstico por RT-PCR y el aislamiento viral. Se tomó 1 g de cada muestra de heces y se diluyó con 9 mL de medio de cultivo de células de mamífero DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium, Sigma-Aldrich Suiza) suplementado con antibióticos [penicilina (500 000 UI/mL) estreptomycin (0,5 g/mL) y fungizona (5 mg/mL)]. Seguidamente, las muestras se homogenizaron por agitación en vórtex

durante un minuto y se centrifugaron a 12 000 g x 15 min, a 4°C. El sobrenadante colectado se filtró por una membrana de celulosa de 0,45 µm.

La extracción del ARN se realizó por el método descrito por David *et al.* (18). El precipitado obtenido se resuspendió en 10 µL de agua libre de nucleasas (Promega) y se conservó a -80°C hasta su evaluación.

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó con el empleo de la enzima M-MLV RT (Promega), 50 ng/µL de cebadores aleatorios (Invitrogen), 10 mM de cada dNTP, 200 µM de DTT y 10 µL del ARN extraído, en unión de 1X de First-Strand Buffer y agua libre de nucleasas para un volumen final de reacción de 20 µL. La mezcla de cebadores, dNTPS, ARN y agua se incubó a 65°C por 5 min para la desnaturalización inicial del ARN y luego se incubó rápidamente en hielo para la hibridación de los cebadores a la cadena de ARN complementaria. Posteriormente, se adicionó el resto de los componentes de la reacción y se sometieron a 37°C por 2 min, 25°C por 10 min, 37°C por 50 min y 70°C por 15 min. El ADNc se almacenó a 20°C hasta su uso.

La detección de BCoV se realizó mediante el ensayo de PCR dirigida a un fragmento del gen N, descrita por Tsunemitsu *et al.* (10). Brevemente, se utilizaron los cebadores NF 5'-GCCGATCAGTCC-GACCAATC-3' y NR 5'-AGAATGTCAGCCGGGG-TAT-3' para la amplificación de un producto de 407 pb. La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 50 µL con 25 pmol/µL de cada cebador, 1X de Go Taq Green Master Mix (Promega) y agua libre de nucleasas. Como control positivo se utilizó la cepa Kakegawa, donada gentilmente por el instituto Pasteur, Sao Paulo, Brasil.

La mezcla se sometió a 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1 min y 72°C por 1 min. Finalmente, 72°C por 7 min. Las reacciones



A



B

Figura 1. Bovinos con síntomas clínicos compatibles con disentería de invierno. A: Ternero con diarreas, B: Diarreas amarillas con coágulos de sangre. / *Bovine herds with clinical signs compatible with winter dysentery. A: Calf with diarrhea, B: Yellow diarrhea with blood clots.*

de PCR se realizaron en un termociclador (Eppendorf, Mastercycler). Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis a 60 mA/100V en un gel de agarosa a 1,5 %.

El aislamiento del virus se realizó en placas de 24 pozos con monocapa confluyente de células de riñón bovino Madin-Darby bovine kidney (MDBK), a una concentración de $3,5 \times 10^5$ células/mL en medio DMEM suplementado con penicilina-estreptomina 100 UI- μ g/mL y con 5 % de suero fetal bovino (Gibco, USA). Se retiró el medio de cultivo de los pozos y se adicionó 200 μ L de las muestras fecales procesadas para aislamiento viral. Después de una hora de adsorción a 37°C, las células se lavaron tres veces con PBS y se adicionaron 800 μ L de medio de mantenimiento DMEM sin suero fetal y se incubaron a 37°C en una incubadora humidificada con 5 % de CO₂. Como controles positivos, se emplearon las mismas células sin inocular. Las monocapas se observaron diariamente durante cinco días para el desarrollo del efecto citopático (ECP) y se realizaron subcultivos después de ser sometidos a tres ciclos de congelación y descongelación. El sobrenadante resultante, después de la segunda inoculación, se centrifugó a 16 000 rpm durante 20 minutos a 4°C, para eliminar los restos celulares y se conservó a -80°C. La identificación de los aislamientos obtenidos se realizó mediante RT-PCR (10).

De las ocho muestras fecales evaluadas, se logró el aislamiento de BCoV en cuatro muestras (M-1, M-2, M-3 y M-7). La multiplicación viral se evidenció por la observación del ECP característico de este virus al quinto día después de la inoculación (Figura 2). El ECP inicialmente se manifestó en todas las muestras como un efecto focal de redondeamiento celular, que más tarde se extendió afectando toda la monocapa celular donde, además, se observaban células redondeadas. Entre las 72 a 96 horas después de la inoculación, se observó que la mayor parte de la monocapa se desprendía, coincidiendo con lo reportado por Betancourt *et al.* (19) y Seid *et al.* (20) para este virus. Las células empleadas como controles permanecieron sin alteraciones durante el tiempo de observación, por lo

que las alteraciones descritas se atribuyeron a la presencia del BCoV. Los aislamientos se confirmaron por RT-PCR en punto final, donde en todos los casos se visualizó el fragmento esperado de 407 pb.

El aislamiento primario del BCoV en cultivo celular es difícil y engorroso, especialmente para su uso en el diagnóstico de rutina (14). Sin embargo, es de gran importancia disponer de nuevos aislados para realizar estudios virológicos y filogenéticos para estudios de evolución viral.

En este estudio, de las ocho muestras analizadas, siete (87,5 %) resultaron positivas al BCoV por el ensayo RT-PCR en punto final (Figura 3) y en solo tres se logró el aislamiento viral. Resultados similares se obtuvieron por Martínez *et al.* (21) donde, de 103 muestras de heces evaluadas para BCoV por ensayo de RT-PCR en punto final, 73 (88 %) muestras resultaron positivas y solo obtuvieron 10 aislamientos virales. En un trabajo realizado por Hansa *et al.* (22), se estudiaron 101 muestras de heces procedentes de terneros con diarreas y solo 15 muestras positivas por aislamiento viral. Las diferencias encontradas pudieran estar sustentadas por lo difícil que resulta el aislamiento viral del BCoV teniendo en cuenta varios aspectos (15,23).

La detección de BCoV directamente de las muestras clínicas en ocasiones resulta una tarea difícil de los laboratorios de diagnóstico, debido a que los coronavirus, de forma general, son virus lábiles a los cambios de temperatura y de muy difícil aislamiento en cultivo celular (9). Además, para la detección del agente directamente de muestras de heces, se realiza la dilución de las muestras con la finalidad de disminuir la concentración de los inhibidores y esto puede impedir la detección del agente en casos en los que la carga viral sea baja. No obstante, esta práctica es útil si se tiene en cuenta que el diagnóstico de disentería de invierno es de rebaño y aun cuando resulten negativos por la dilución de las muestras de aquellos animales que estén recuperándose o en el inicio de la infección. La calidad de las muestras de los animales que se encuentren en el periodo de infección, en los que la

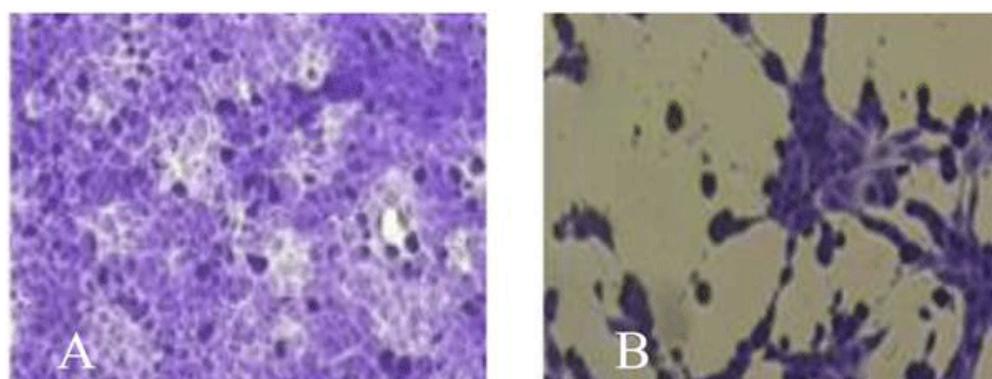


Figura 2. Cultivo de células MDBK. Tinción con cristal violeta. A: Control de células no inoculadas. B: Agrupación de células redondeadas y retracción de la monocapa celular inoculada con muestras fecal M-1. / MDBK cell culture. Crystal violet staining. A: Control of non-inoculated cells. B: Clustering of rounded cells and retraction of the cell monolayer inoculated with fecal M-1 samples.

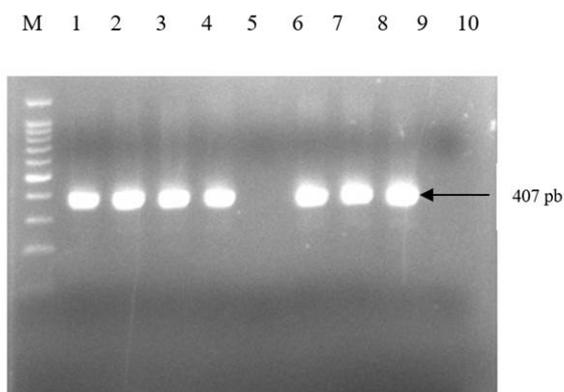


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de la RT-PCR en punto final para la detección de BCoV en muestras fecales. M: Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, USA), Líneas: 1: M-1, 2: M-2, 3: M-3, 4: M-4, 5: Control negativo de extracción, 6: M-5, 7: M-6, 8: M-7, 9: M-8, 10: Control negativo del PCR (agua libre de nucleasas). / *Agarose gel electrophoresis of endpoint RT-PCR for BCoV detection in stool samples. M: 100 bp molecular weight marker (Promega, USA), Lanes: 1: M-1, 2: M-2, 3: M-3, 4: M-4, 5: Negative extraction control, 6: M-5, 7: M-6, 8: M-7, 9: M-8, 10: Negative PCR control (nuclease-free water).*

carga viral sea máxima, permitirá la detección positiva de las mismas y la secuenciación directa del genoma del virus.

En el presente trabajo se aisló e identificó el BCoV, a partir de muestras de heces de bovinos con cuadro clínico compatible con la disentería de invierno, y se obtuvieron nuevos aislados virales para realizar estudios moleculares y de evolución viral.

REFERENCIAS

1. Moussa SA, Afify AF, Salah S, Hamed A. Isolation and molecular characterization of bovine coronavirus from calves with acute gastroenteritis in Egypt. *Hosts and Viruses*. 2021;8(2):29-38.
2. Betancourt A, Rodríguez E, Barrera M. Dysentery of winter: Recognition, diagnosis and control. *Revista Electrónica de Veterinaria RED-VET*. 2005a;VI (7).
3. Betancourt A, Rodríguez E, Barrera M. Bovine coronavirus: Neumoenteric infections. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. 2006b;VII (12).
4. Mebus CA, With RG, Stair EL, Rhodes MB, Twiehaus MJ. Neonatal calf diarrhea: Results of a field trial using a Reo-like virus vaccine. *Vet. Med. Small Animal Clinician*. 1972;67:173-178.
5. Mebus CA, Stair EL, Rhodes MB, Twiehaus MJ. Neonatal calf diarrhea: Propagation, attenuation, and characterization of a coronavirus like agent. *Am. J. Vet. Res.* 1973;34:145-150.
6. Saif LJ, Redman DR, Moorhead PD, Theil KW. Experimentally induce coronavirus infections in calves: viral replication in the respiratory and intestinal tracts. *Am. J. Vet. Res.* 1986;47:1426-1432.

7. Storz J, Stine A, Liem C, Anderson GA. Coronavirus isolation from nasal swab samples in cattle with signs of respiratory tract disease after shipping. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1996;208:1452-1455.
8. Barrera M, Rodríguez E, Betancourt A, Frías MT, Brandão P. Short communication. First report in Cuba of bovine coronavirus detection in a winter dysentery outbreak. *Span. J. Agric. Res.* 2006;4(3):221-224.
9. Ribeiro J, Lorenzetti E, Fernandes A, Alcindo A. Molecular detection of bovine coronavirus in a diarrhea outbreak in pasture-feeding Nellore steers in southern Brazil. *Trop Anim Health Prod.* 2016;48:649-653.
10. Tsunemitsu H, Smith DR, Saif LJ. Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR. *Arch. Virol.* 1999;144(1):167-175.
11. Martínez A, Caballero M, Silva S, Jiménez C. Aislamiento y caracterización de coronavirus bovino asociado a un brote de diarrea epizootica (Disenteria Bovina) en bovinos adultos en Costa Rica. *ES-PE, Sangolquí*. 2002.
12. Temizkan SS, Alkan F. Bovine coronavirus infections in Turkey: molecular analysis of the full-length spike gene sequences of viruses from digestive and respiratory infections. *Arch Virol.* 2021;166:2461-2468.
13. Oma VS, Travén M, Alenius S, Myrmel M, Stokstad M. Bovine coronavirus in naturally and experimentally exposed calves; viral shedding and the potential for transmission. *Virology Journal.* 2016;13(100).
14. Heckert RA, Saif LJ, Mengel JP, Myers GW. Mucosal and systemic antibody responses to bovine coronavirus structural proteins in experimentally challenge - exposed calves fed low or high amounts of colostrum antibodies. *Am. J. Vet. Res.* 1991;52:700-708.
15. Hodnik JJ, Ježek J, Starič J. Coronaviruses in cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* 2020;52(6):2809-2816.
16. Decaro N, Campolo M, Desario C, Cirone F, D'Abramo M, Lorusso E. Respiratory disease associated with bovine coronavirus infection in cattle herds in Southern Italy. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2020;20(1):28-32.
17. Amer HM, Almajhdi FN. Development of a SYBR Green I based real-time RT-PCR assay for detection and quantification of bovine coronavirus. *Mol. Cell. Prob.* 2011;25:101-107.
18. David D, Storm N, Ilan W, Sol A. Characterization of winter dysentery bovine coronavirus isolated from cattle in Israel. *Viruses.* 2021;13:10710.
19. Betancourt A, Rodríguez E, Relova, D, Barrera M. Aislamiento de coronavirus bovino por primera vez en Cuba. *RevSalud Anim.* 2007;29(2):128-132.

20. Seid U, Dawo F, Tesfaye A, Ahmednur M. Isolation and Characterization of Coronavirus and Rotavirus Associated with Calves in Central Part of Oromia, Ethiopia. *Vet. Medi. Int.* 2020:1-10.
21. Martínez A, Silva S, Caballero M, Pichardo M, Cortés R, Bonilla JL. *Jornada de Investigación en Ganadería de la Leche. Memorias.* 2016
22. Hansa A, Rai RB, Dhama K, Wani MY, Saminathan M, Ranganath GJ. Isolation of Bovine Coronavirus (BCoV) in vero cell line and its confirmation by direct FAT and RT-PCR. *Pakistan J. of Biolog. Scienc.* 2013;16(21):1342-1347.
23. Ellis J. What is the evidence that bovine coronavirus is a biologically significant respiratory pathogen in cattle? *Can. Vet. J.* 2019;60(2):147-152.

Declaración de conflictos de intereses: Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribución de los autores: **Maray Curiel Hernández:** participó en el diseño y ejecución de los experimentos, en el análisis de los resultados y en la escritura del documento. **Cristian Díaz Corona y Adriana Mesa Delgado:** participaron en el diseño, ejecución de los experimentos y en el análisis de los resultados. **Ana María Acevedo Beiras:** participó en el diseño, ejecución de los experimentos, en el análisis de los resultados y en la revisión del documento. **Liani Coronado Báez:** participó en el diseño, ejecución de los experimentos y en el análisis de los resultados. **Yalainne Obret Ferrer y Gisselle Chávez Rodríguez:** participaron en la ejecución de los experimentos. **Carmen Laura Perera González:** concibió la idea de investigación, participó en el diseño de los experimentos, en el análisis de los resultados, en la escritura y revisión final del documento. Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final del documento

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)