

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS VETERINARIAS**



**DETECCIÓN DE CORONAVIRUS BOVINO ASOCIADO AL COMPLEJO
RESPIRATORIO BOVINO EMPLEANDO LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL EN GANADO DE ENGORDA
ESTABULADO DEL VALLE DE MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MEXICO**

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA

KELVIN ORLANDO ESPINOZA BLANDON

DIRECTOR DE TESIS

DR. FRANCISCO JAVIER MONGE NAVARRO

CO-DIRECTOR DE TESIS

DR. GILBERTO LÓPEZ VALENCIA

MEXICALI, B. C., SEPTIEMBRE DE 2017.

Detección de coronavirus bovino asociado al complejo respiratorio bovino empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real en ganado de engorda de Mexicali, Baja California, México. Esta tesis se realizó bajo la dirección del Comité Particular abajo indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

DR. FRANCISCO JAVIER MONGE NAVARRO
DIRECTOR DE TESIS

DR. GILBERTO LÓPEZ VALENCIA
CO-DIRECTOR DE TESIS

DR. SERGIO ARTURO CUETO GONZÁLEZ
ASESOR

DR. JOSÉ CARLOMAN HERRERA RAMÍREZ
ASESOR

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincero agradecimiento al pueblo mexicano, y en especial al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Por haberme permitido la oportunidad de realizar la Maestría en Ciencias Veterinarias.

Agradezco profundamente a mi tutor de tesis Dr. Francisco Javier Monge Navarro, por haberme brindado esta gran oportunidad de trabajar con él, por haber tenido la paciencia necesaria, transmitirme sus conocimientos y apoyarme en todo momento. También quiero agradecer de manera muy especial al Dr. Gilberto López Valencia, por su grata colaboración, por sus valiosos consejos, sus enseñanzas y apoyo incondicional, También deseo agradecer a los sinodales encargados de revisar y corregir este trabajo, al Dr. José Carlomán Herrera Ramírez, y al Dr. Sergio Arturo Cueto Gonzáles, asimismo le agradezco a la Dra. Maritza Manríquez por su apoyo en todo momento, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme permitido realizar la Maestría en Ciencias Veterinarias a través de la beca proporcionada, porque gracias a ello, fue posible mi preparación profesional en este bello país.

Para finalizar quiero agradecer a todas aquellas personas que contribuyeron en las diferentes fases de este proyecto de vida, haciendo que mi estancia en este lugar fuera placentera y por supuesto inolvidable.

DEDICATORIA

La presente Tesis está dedicada a mi familia, en especial a mis padres, abuelos y a mi esposa, ya que siempre me brindaron todo su apoyo para poder culminar esta etapa de mi vida, a mis amigos, compañeros, y todas aquellas personas que contribuyeron en mi desarrollo tanto personal como profesional, haciendo que la culminación de mis estudios fuera posible.

Con dedicación especial a Dios, ya que sin el nada es posible.

RESUMEN

DETECCIÓN DE CORONAVIRUS BOVINO ASOCIADO AL COMPLEJO RESPIRATORIO BOVINO EMPLEANDO LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL EN GANADO DE ENGORDA ESTABULADO DEL VALLE DE MEXICALI, BAJA CALIFORNIA MEXICO

El coronavirus bovino (BoCV) es reconocido como patógeno de distribución mundial implicado en infecciones del tracto respiratorio, siendo causa importante de fiebre de embarque y enfermedad asociada al complejo respiratorio bovino (CRB) en ganado de engorda. El presente trabajo tiene como objetivo el desarrollo y la instrumentación de una plataforma RT-PCR que detecta y amplifica la proteína S del BoCV, resultando en una plataforma de diagnóstico molecular altamente sensible y específico para la detección de BoCV a partir de muestras de exudado nasal. Se analizaron 50 muestras de exudado nasal empleando la plataforma RT-PCR para BoCV. Las muestras provenían de animales clasificados como enfermos (n = 30) con CRB y animales aparentemente sanos (n = 20). Los resultados obtenidos muestran que 19 de ellas resultaron positivas para una prevalencia general estimada de 38%. Sobresale el hecho que 5/30 de las muestras del grupo de animales enfermos resultaron positivas a las pruebas, mientras que de las muestras provenientes del grupo de animales aparentemente sanos, 14/20 resultaron positivas. Contrario a lo que se anticipaba, el 70% de los animales del grupo de animales sanos resulto positivo a la plataforma RT-PCR para BoCV. Este estudio amplía el conocimiento de los virus asociados con el CRB en la región ganadera del noroeste de México ya que es la primera vez que se reporta la presencia del BoCV con una prueba confirmatoria, colocando al BoCV en la segunda posición de la tabla de prevalencia de virus asociados al CRB detectados en la zona en un estudio previo. Con base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que el BoCV se encuentra presente en el

ganado estabulado de los sistemas de explotación de bovinos de engorda del valle de Mexicali, Baja California y que la plataforma RT-PCR para BoCV aquí desarrollada es una herramienta de diagnóstico molecular rápida, sensible y específica para detectar el BoCV en muestras de exudado nasal proveniente de ganado de engorda estabulado. La prevalencia de 38.0% para BoCV en ganado de engorda estabulado reportada en este trabajo debe ser el punto de partida para futuras investigaciones del papel que juega este virus en la presentación del CRB en los sistemas de explotación de bovinos de engorda de la región.

ABSTRACT

DETECTION OF BOVINE CORONAVIRUS ASSOCIATED TO THE BOVINE RESPIRATORY COMPLEX USING REAL-TIME POLIMERASE CHAIN REACTION TECHNIQUE IN FEEDLOT CATTLE FROM THE MEXICALI VALLEY IN BAJA CALIFORNIA, MEXICO

Bovine coronavirus (BoCV) is recognized as a pathogen of global distribution implicated in respiratory tract infections, being an important cause of shipping fever and bovine diseases associated to the bovine respiratory disease complex (BCR) in feedlot cattle. The objective of this work is the development and the instrumentation of a RT-PCR platform that detects and amplifies the BoCV S protein, resulting in a highly sensitive and specific molecular diagnostic platform for the detection of BoCV from nasal exudate samples. Fifty samples of nasal exudate were analyzed using the RT-PCR platform for BoCV. Samples were classified as sick (n = 30) and apparently healthy (n = 20). The results show that 19 of samples resulted positive to BoCV for an overall prevalence of 38%. It is noteworthy that 5/30 of the samples from the group of sick animals were positive to the test, whereas 14/20 resulted positive from the group of apparently healthy animals. Contrary of what was anticipated, 70% of the samples from the group of healthy animals were positive to the RT-PCR platform for BoCV. This study expands the knowledge of the virus associated with CRB in the cattle from the Northwest region of Mexico since it is the first report for the presence of BoCV using a confirmatory test, placing the BoCV in the second position of the prevalence table of viruses associated with BCR detected in the area. Based on the results obtained in the present study, it is concluded that the BoCV is present in the livestock cattle of the feedlot cattle operations of the valley of Mexicali, Baja California and that the RT-PCR platform for BoCV developed here is a rapid, sensitive and specific molecular diagnostic tool for detecting BoCV in samples of nasal exudate from feedlot cattle. The prevalence of 38.0% for BoCV in feedlot cattle reported in this study should be the starting point for future investigations of the role of this virus in the presentation

of CRB in the systems of exploitation of beef cattle in the region.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
I. REVISIÓN DE LITERATURA	3
1.1 Epidemiología.....	3
1.2 Propiedades biológicas del BCoV.....	4
1.3 Transmisión	5
1.4 Patogenia	6
1.5 Manifestaciones clínicas.....	8
1.6 Características anatómicas e histopatológicas.....	9
1.7 Diagnóstico	10
II. MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.1 Ubicación	14
2.2 Equipo básico.....	14
2.3 Equipos accesorios y consumibles de laboratorio.....	14
2.4 Diseño de Oligonucleótidos para BoCV	15
Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó el programa Primer3Plus versión 2006-2007	16
2.5 Reconstitución de oligonucleótidos.....	16
2.6 Mezcla Maestra.....	16
2.7 Muestras de exudado nasal	17
2.8 Controles positivos de ARN para BoCV	18
2.9 Extracción de ARN de exudado nasal.....	18
2.10 Protocolos de pruebas RT-PCR.....	19
2.11 Interpretación de resultados	20
III. RESULTADOS	21
3.1 Estandarización del RT-PCR para BoCV	21
3.2 Resultados del RT-PCR para muestras de sangre	21
IV. DISCUSIÓN.....	24
V. CONCLUSIONES.....	29
REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	30

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1	Secuencia y características de los oligonucleótidos diseñados a partir del gen de BoCV-S.	15
Cuadro 2.2	Reactivos y volumen de reacción para el RT-PCR de BoCV.	16
Cuadro 2.3	Resultados generales del RT-PCR para BoCV de bovinos de engorda estabulados con y sin síntomas de enfermedades respiratorias.	22

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 3.1 Curva de ampliación de los controles de BoCV extraídos de la vacuna Scourguard 4 K/C utilizando los oligonucleótidos BoCVf y BoCVr a una concentración de 400 μ l de ARN templete. 22
- Figura 3.2 Curva de disociación (T_m) de los controles positivos del RT-PCR para BoCV mostrando una temperatura promedio de 77.0 °C. 23
- Figura 3.3 Curva de ampliación en muestras de exudado nasal probadas por el sistema RT-PCR para BoCV. 23

INTRODUCCIÓN

El complejo respiratorio bovino (CRB) es el síndrome infeccioso que se presenta con mayor frecuencia en los sistemas comerciales tecnificados dedicados a la explotación de bovinos de engorda, y es la principal causa de mortalidad y morbilidad en becerros recién ingresados a corral (Cernicchiaro et al., 2012).

La diarrea viral bovina (VDVB), el virus sincitial respiratorio bovino (BRSV), el virus de la rinitis infecciosa bovina (RIB), el virus de la parainfluenza 3 (PI3V), bacterias como *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella somni multocida* e *Histophilus somni* son considerados los principales responsables del conjunto de enfermedades asociadas al CRB (Booker et al., 2008; Gagea et al., 2006). Recientemente se ha reconocido al coronavirus bovino (BCoV) como un agente viral importante asociado al CRB (Saif et al., 2010).

El BoCV es considerado como la segunda causa de diarrea que afecta a los becerros durante las primeras 3 semanas de vida, con afectaciones del tracto respiratorio y asociado con disentería de invierno en el ganado adulto. Los resultados de la enfermedad producida por el BoCV son responsables de pérdidas económicas importantes para las industrias lecheras y de vacuno en todo el mundo, no son sólo por el aumento en la tasa de mortalidad en animales jóvenes, la cual puede llegar al 80% en casos complicados, sino que también por incremento en los costos por servicios veterinarios, terapias y medicamentos, además de la consecuente reducción en la productividad por disminución de la ganancia de peso en los animales afectados. (Haitham et al., 2011). Las encuestas serológicas indican que aproximadamente 90% de la población mundial de ganado tiene anticuerpos contra el BCoV. Sin embargo, es también conocido que distintas cepas de coronavirus las cuales han sido detectadas en perros, caballos, cerdos y rumiantes silvestres, con evidencia de transmisión experimental entre estas especies animales hacia el ganado bovino, afectando principalmente a

animales jóvenes (Bok et al., 2015). En México, se ha reportado la presencia de coronavirus en cerdos (Piñeros y Mogollón, 2015), sin embargo; la disponibilidad de información científica de coronavirus en bovinos de nuestro país es sumamente escasa o no se encuentra disponible, limitándose a reportes informativos generados por las compañías farmacéuticas dedicadas a la producción y distribución de vacunas. La aplicación de tecnologías modernas basadas en técnicas moleculares han sido incorporadas durante la última década para detectar e identificar de manera más rápida y eficiente las enfermedades que afectan a las distintas especies animales, especialmente aquellas dedicadas a la producción de alimentos y animales de compañía, las cuales, debido a la importancia que tienen dentro de la producción de alimentos o la transmisión de enfermedades entre animales y de carácter zoonótico, requieren ser abordadas para lograr una mejor comprensión de la dinámica particular a cada especie, en la búsqueda de soluciones para hacer más eficiente, segura y rentable la actividad pecuaria actual.

I. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Epidemiología

El coronavirus bovino (BoCV) es un importante patógeno del ganado causante de enfermedades entéricas en terneros recién nacidos (diarrea neonatal de terneros) y bovinos adultos (disentería de invierno). El virus también está implicado en las infecciones del tracto respiratorio de terneros en crecimiento y la neumonía por fiebre del transporte en el ganado de engorde. Algunas cepas de virus BoCV también pueden ser responsables de infecciones entéricas y respiratorias simultáneas. Aunque las infecciones por BoCV tienen una alta morbilidad que puede llegar al 100% (Ribeiro et al., 2016). También considerando la alta prevalencia en todo el mundo, las pérdidas económicas son sustanciales en las granjas lecheras y de ganado bovino debido a la repentina y dramática reducción de la producción de leche y la pérdida de peso corporal. (Oma et al., 2016).

A medida que se incrementa el número de animales dentro de las explotaciones pecuarias, la crianza artificial de becerros se hace cada vez más intensiva, lo que conlleva a la co-existencia de una gran cantidad de animales alojados en una determinada superficie de terreno pero buscando siempre lograr la mayor concentración de animales por unidad de superficie, lo cual aumenta el contacto directo entre los animales, aumenta los niveles de contaminación ambiental, se favorece la dispersión, mantenimiento y transmisión de agentes patógenos que ocasionan una mayor frecuencia de enfermedades infecciosas que pueden ocasionar la muerte de una proporción de animales enfermos (Gulliksen et al., 2009).

En México, la información epidemiológica referente a morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas en el ganado, especialmente en animales jóvenes, no siempre se encuentra disponible o no está debidamente actualizada. En países como los Estados Unidos, donde se cuenta con información actualizada sobre morbilidad y mortalidad por enfermedades tanto en

animales adultos como en becerros, se reporta que la mortalidad neonatal por enfermedades respiratorias en bovinos de engorda es de 6.6%, cifra que aumenta a 18.7% de muertes para becerros nacidos de madres primíparas. En lo que respecta a enfermedades gastrointestinales, la presencia de diarrea en neonatos de explotaciones lecheras corresponde a la enfermedad más frecuentemente reportada y se le atribuye el 75% de la mortalidad de becerros dentro de las primeras 3 semanas de vida (Santibáñez et al., 2012). El BoCV es causante de una serie de enfermedades con distintos cuadros clínicos, siendo el síndrome de infecciones intestinales con diarrea en becerros el más reconocido y documentado, sin embargo, son cada vez más frecuentes los reportes de cuadros clínicos con afectación de las vías respiratorias en becerros y ganado de engorda adulto (Kapil et al., 2010).

1.2 Propiedades biológicas del BCoV

El BCoV es un virus no envuelto de aproximadamente 120 nanómetros (nm) de diámetro con genoma ARN de banda sencilla y polaridad positiva que pertenece a la familia *Coronaviridae* dentro del género *Betacoronavirus*; en esta familia de virus también se incluye el coronavirus humano OC43 (HCoV-OC43) y SARS, ambos causantes de infecciones respiratorias severas en humanos. El genoma del BCoV está conformado por cinco proteínas estructurales denominadas nucleocápside (N), glucoproteína transmembrana (M), hemaglutinina esterasa (HE), glucoproteína espiga (S) y proteínas de envoltura (E). La glucoproteína S comprende dos subunidades (S1 y S2) y juega un papel importante durante la interacción entre el virus y la célula del huésped al ser el componente estructural relacionado con el tropismo y especificidad hacia las células blanco durante la patogénesis viral, (Ribeiro et al., 2016). Por otra parte, las proteínas M y E desarrollan su función principal durante la fase de ensamblaje y empaquetamiento del ARN viral. La proteína N es una fosfoproteína que interactúa con el ARN viral para formar la nucleocápside viral (Santibáñez et al., 2012).

Una vez que el ARN viral es liberado dentro del citoplasma de la célula infectada, el genoma de BoCV es inicialmente sintetizado en dos poliproteínas: pp1a y pp1ab de 440-500 KDa y de 740-810 KDa respectivamente, que dan origen a 16 proteínas no estructurales (NSP). La poliproteína pp1a da origen a NSP1 hasta NSP11, mientras que la pp1ab origina a NSP12 hasta NSP16. Las funciones de estas proteínas no se están totalmente definidas por lo que actualmente son motivo investigación. Sin embargo; se sabe que NSP1 está relacionada con los procesos de regulación de la traducción del genoma viral. NSP3 y NSP5 funcionan como enzimas encargadas del desdoblamiento, síntesis y procesamiento de proteínas; NSP4 y NSP6 tienen funciones en anclaje de los viriones inmaduros a la membrana plasmática de la célula infectada; NSP7, NSP8, NSP9 y NSP10 es un grupo de proteínas de pequeño peso molecular que actúan como co-factores en la actividad de la ARN polimerasa. NSP12 es la polimerasa ARN dependiente de ARN viral; NSP13 corresponde a la helicasa viral; NSP14 participa como una exonucleasa y al parecer está involucrada en la etapa de procesamiento del ARN; NSP15 participa como endonucleasa; NSP16 se comprobado que tiene actividad 2-O-metiltransferasa, cuyo papel está dado en la protección del ARN de la acción de NSP15 (Lai et al., 2007).

1.3 Transmisión

En un estudio reciente sobre supervivencia ambiental de dos especies de coronavirus (CoV) animales se logró demostrar que estos virus mantuvieron su capacidad infectiva en cuerpos de agua naturales y en aguas residuales a 27 °C por períodos de 3-4 semanas y a 4 °C hasta por un año. A pesar de la capacidad de los CoV para persistir en el medio ambiente, aún no se ha investigado el papel que pueden jugar ciertos alimentos o bebidas potencialmente contaminados con agua que contiene CoV y que se distribuyen como productos listos para consumir y que pudieran funcionar como posible vehículo de transmisión hacia los humanos u otros animales o como fuente de recombinación genética durante las co-infecciones entre CoV de animales y humanos (Mullis et al., 2012).

Las infecciones con BoCV ha sido reportadas en todo el mundo y se considera como una infección endémica persistente en muchos rebaños de ganado lechero y de engorda. La principal vía de transmisión es a través de la ruta horizontal fecal-oral, aunque se ha demostrado el contagio a través de la vía respiratoria por inhalación de aerosoles que contienen las partículas virales. El virus se disemina rápidamente por contacto directo con las heces de los casos clínicos o por fomites tales como alimento, agua, herramientas y equipos contaminados. Además, existen animales portadores intestinales del BoCV clínicamente sanos que eliminan el virus al medio, a su vez, las vacas gestantes también participan en la transmisión eliminando el virus durante el proceso de periparto infectando a la cría al momento del nacimiento (Betancourt et al., 2005). Datos estimados calculan que la tasa de excreción del virus es de un 50 a 60% del ganado durante los meses de invierno, 65% al momento del parto y 71% dos semanas después del parto (Santibáñez et al., 2012).

1.4 Patogenia

El BoCV ingresa al organismo normalmente por ingestión o inhalación. Cuando la puerta de entrada es el tracto gastrointestinal el virus infecta las células epiteliales del intestino delgado y el colon, donde ocurre una replicación local que produce atrofia de las vellosidades intestinales. Debido a esto, las enzimas situadas en la membrana de las células epiteliales, especialmente las del intestino delgado no actúan de manera suficiente al alimento ingerido, ocasionando mala digestión y baja absorción de nutrientes. La degeneración de las células epiteliales por la infección con BoCV también una insuficiente absorción de agua y electrolitos e incrementan la función secretora, desencadenando el cuadro clínico de la diarrea, lo que lleva a la deshidratación, acidosis e hipoglucemia, pudiendo provocar a la muerte, sobre todo en animales muy jóvenes. En individuos recuperados de las infección causadas por el BoCV, las criptas del epitelio de la mucosa intestinal pueden recuperarse y eventualmente volver a su funcionamiento fisiológico normal sin secuelas aparentes. En estudios realizados durante las

primeras horas en heces diarreicas se ha calculado que pueden contener hasta 1×10^{10} unidades formadoras de placa (PFU) virales por mililitro (Betancourt et al., 2006). Cuando la puerta de entrada del BoCV ocurre a través de las vías respiratorias, el virus infecta el epitelio respiratorio de las vías superiores, diseminándose hacia las regiones vecinas, ocasionando inflamación severa y conjuntivitis. La cantidad de virus presente en fragmentos de pulmones de individuos con enfermedad respiratoria se ha calculado entre 1×10^3 y 1.2×10^7 PFU por gramo de tejido pulmonar. (Storz et al., 2000).

El acoplamiento del BoCV a la superficie de las células de los epitelios respiratorio o digestivo se produce a través de la unión de la proteína S del virus con receptores que contienen fragmentos de ácido siálico localizados en la superficie de la membrana citoplasmática de la célula. Esta unión induce a un cambio conformacional de la proteína S que activa la fusión de la membrana celular dando como resultado la internalización del virus por endocitosis. Posteriormente, la nucleocápside viral es liberada al citoplasma y el ARN genómico viral se traduce para formar una poliproteína, la cual funciona como templete para la síntesis de las proteínas no estructurales pp1a y pp1ab que originan la ARN replicasa del complejo transcriptasa encargado de sintetizar la banda hebra negativa de ARNm subgenómico, que sirve de molde para el inicio de la transcripción y síntesis del resto de las proteínas estructurales y no estructurales del virus (Santibáñez et al., 2012).

Una vez que se transcribe el ARNm subgenómico, cada uno de los ARNm se traduce en proteína para producir sólo el polipéptido codificado del ARNm, lo que permite la traducción de las demás proteínas estructurales del virion. La proteína N y el ARN recién sintetizado se ensamblan en el citoplasma para formar la nucleocápside. La proteína N interactúa con la proteína M en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi; la proteína E se une con la M, lo que genera un sistema de andamiaje para el ensamblaje viral; la glucoproteína S se glucosila y es transportada a través del aparato de Golgi donde finaliza su

procesamiento. Las proteínas S y HE interactúan en el plano de la bicapa lipídica del compartimiento de gemación con la proteína M. La proteína S excedente no incorporada a los viriones permanece en el aparato de Golgi donde se acumula. Los viriones se forman en un compartimiento de gemación entre el retículo endoplásmico rugoso (RER) y el aparato de Golgi de la célula infectada. Los viriones formados se liberan por la fusión de las vesículas que contienen los viriones con la membrana plasmática. (Lai et al., 2007). El proceso de replicación viral provoca diversos efectos citopáticos como necrosis, apoptosis y fusión de membranas celulares que finalmente interfieren en los diferentes procesos funcionales y metabólicos de la célula infectada (Tan et al., 2007).

1.5 Manifestaciones clínicas

Los signos y síntomas de la infección por BoCV pueden ser leves e imperceptibles o graves y evidentes e incluyen fiebre, ruidos respiratorios, secreción nasal, tos, malestar general, debilidad y diarrea con o sin sangre (Oma et al., 2016). En becerros inoculados experimentalmente por vía nasal y traqueal se ha observado infección respiratoria acompañada de diarreas, presentándose al inicio como una rinitis con tos, fiebre, debilidad, inapetencia, lagrimeo y secreción nasal serosa y traqueítis. La enfermedad natural cursa con diarreas líquidas profusas que pueden persistir durante 2-6 días, anorexia, pirexia y deshidratación; algunos becerros contienen restos de sangre en sus heces. La morbilidad y mortalidad son altas y becerros con diarreas sanguinolentas pueden experimentar una hipovolemia a las pocas horas de haber comenzado los signos clínicos (Betancourt et al., 2006).

En bovinos adultos la enfermedad producida por el BoCV se caracteriza por elevada morbilidad que va del 50-100% aunque la mortalidad es baja y no sobrepasa el 1-2% de los animales. Clínicamente se manifiesta con diarreas líquidas y fétidas que en ocasiones presentan sangre y moco, disminución de la producción de leche que puede ir de 25 a 95%, depresión, anorexia, tos y

descargas nasales y lagrimales (Betancourt et al., 2009). Los brotes de diarrea en ganado lechero durante la temporada de invierno se conocen como disentería de invierno (*winter disease*) y se caracteriza por la presencia de diarrea acuosa oscura que se acompaña de depresión variable y anorexia, (Oma et al., 2016). Los individuos que se recuperan de la infección por BoCV generan inmunidad durante 1 a 5 años, sin embargo; pueden existir becerros portadores del virus el cual es eliminado al medio ambiente después de 24 a 48 horas post-infección con una persistencia de la excreción viral por más de 15 días, lo que se traduce en una fuente de virus para que favorece la repetición de un brote en el rebaño (Santibáñez et al., 2012).

1.6 Características anatómicas e histopatológicas

Al realizar la necropsia en terneros con cuadro entérico sacrificados entre 24-48 horas post- inoculación, las lesiones no son tan evidentes; con el incremento de las diarreas, el estómago se observa distendido con leche coagulada en su interior. En el intestino se puede observar dilatación, flacidez y el aumento del contenido líquido amarillo; los becerros muestran signos de deshidratación y trastornos circulatorios, básicamente congestión y hemorragias petequiales en ciego y colon espiral; los ganglios linfáticos mesentéricos se observan aumentados de tamaño. Microscópicamente el examen de los intestinos de becerros sacrificados revela cambios mínimos en las células del epitelio del intestino delgado y el epitelio del colon, los cuales pueden conservar su morfología fisiológica, aunque es posible observar numerosos acúmulos de antígenos virales en su superficie. Durante esta fase de la infección el virus puede ser detectado por técnicas de inmunohistoquímica. (Betancourt et al., 2009).

En bovinos adultos el intestino delgado se encuentra dilatado y flácido, pudiendo observarse un contenido oscuro y fluido, algunas veces mezclado con moco y sangre. También pueden observarse lesiones inflamatorias con presencia de exudado catarral, sangre en la serosa, edema en la pared intestinal y mucosa congestionada, en el colon las lesiones consisten en hemorragias petequiales y

lineares, apreciando un acortamiento de la superficie de la mucosa. Las lesiones microscópicas en bovinos adultos son más evidentes en el colon donde las criptas del epitelio exhiben degeneración, necrosis y atrofia; también se aprecia con frecuencia hemorragias petequiales, que pueden observarse también a lo largo de la mucosa del intestino delgado (Betancourt et al., 2006).

1.7 Diagnóstico

El BoCV ocasiona infecciones gastrointestinales en animales jóvenes, disentería de invierno en bovinos adultos e infecciones del tracto respiratorio en bovinos de todas las edades con las subsecuentes repercusiones económicas por baja en la producción de leche o ganancia de peso, terapias y tratamientos antibióticos, servicios veterinarias, alojamiento, alimento, etc. El diagnóstico temprano y certero de infección por BoCV contribuye a la implementación temprana de medidas de control y ayuda a disminuir la carga económica en los sistemas de explotación de bovinos lecheros o de engorda (Amer et al., 2013). Para establecer un diagnóstico definitivo de BoCV no es suficiente con la identificación de signos y síntomas, de tal forma que en la actualidad existen distintas pruebas de laboratorio para identificar el virus y establecer el nivel de infección en un hato. Cuando el BoCV fue propuesto como agente causal de enfermedad del tracto digestivo o respiratorio del ganado, inicialmente se realizaba la identificación del virus por medio de microscopía electrónica, posteriormente se logró también evidenciar la replicación viral por hemo-adsorción, a partir de la identificación del efecto citopático como resultado de la inoculación de aislados virales en cultivos celulares; también por serología, empleando anticuerpos monoclonales o policlonales asociados a técnicas de inmunofluorescencia o inmunohistoquímica en tejidos afectados y actualmente, por medio de la aplicación de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR) dirigida a identificar distintos componentes del genoma viral con bastante éxito (MacLahlan y Dubovi 2011).

A pesar de la gran variedad de pruebas y metodologías disponibles para el diagnóstico de BCoV, los sistemas ELISA han sido el grupo de pruebas más ampliamente utilizados para el diagnóstico de esta enfermedad en el ganado. Los reportes de la utilización de sistemas ELISA datan de la década de 1980 y han sido practicados tanto en bovinos lecheros como en bovinos de engorda. Las muestras más utilizadas en este tipo de pruebas de diagnóstico para ganado lechero incluyen heces diarreicas, leche y leche del tanque. Estas plataformas ELISA están diseñadas para detectar antígenos virales a partir de anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos principalmente contra la proteína S. Los reportes de esos estudios indican prevalencias con rango de 25-55% de muestras positivas en Norteamérica, incluyendo los Estados Unidos y Canadá, Europa y Australia, siendo mayor la prevalencia de BoCV en muestras procedentes de ganado lechero comparado con el ganado de engorda. Asimismo, esos estudios reportan que los procedimientos ELISA para detectar antígenos presentan de 10-30% de falla para detectar el BoCV en las muestras mencionadas, lo cual disminuye considerablemente la especificidad de esa herramienta serológica (Izzo et al., 2011). Los sistemas ELISA que detectan anticuerpos contra BoCV también son utilizados para establecer el diagnóstico de esta infección en el ganado. Los reactivos listos para usarse de Svanovir (Boehringer Ingelheim Svanova, Uppsala, Sweden) para coronavirus bovino son uno de los sistemas basados en la detección de anticuerpo IgG más ampliamente utilizados tanto en ganado lechero como en ganado de carne, sin embargo la sensibilidad y especificidad de esta plataforma varía mucho entre ganado lechero y de engorda y en muestras de suero o leche (Ohlson et al., 2010)

El incremento en los reportes de enfermedad respiratoria o gastrointestinal con diarrea profusa asociada a infección con BoCV busquen nuevas alternativas depara la detección rápida y específica de esta y otros tipos de infecciones virales que afectan al ganado, ya que la detección temprana de una infección viral como la ocasionada por el BoCV permite la instrumentación de medidas profiláctica de control y evita la propagación de la infección dentro del hato o hacia otras

explotaciones en una región. En ese sentido, las técnicas de diagnóstico molecular actuales para detección e identificación de enfermedades virales generan resultados en muy corto tiempo, con niveles de sensibilidad y especificidad prácticamente del 100%. Las pruebas de diagnóstico molecular más frecuentemente utilizadas para el diagnóstico de BoCV incluyen plataformas PCR convencional y PCR en tiempo real, las cuales están diseñadas a detectar y amplificar distintos genes virales (Belak, 2007). Como ya se ha mencionado, el genoma de BCoV codifica para 5 proteínas estructurales principales conocidas como hemaglutinina-esterasa (HE), glucoproteína espiga (S) proteína de membrana pequeña (E), proteína transmembrana (M) y nucleocápside (N). De ellas sobresale la proteína S, una proteína de 180 KDa ubicada en la superficie viral responsable del acoplamiento inicial del virus sobre la superficie de la célula, iniciando el proceso de infección. Con aproximadamente 1,350 aminoácidos de longitud, la proteína S también desempeña un papel sumamente importante en la inducción de anticuerpos neutralizantes. El gen que codifica para la proteína S es altamente conservado entre las cepas de BoCV y ha sido ampliamente utilizado como gen objetivo para el diseño e instrumentación de pruebas moleculares para diagnóstico de esta enfermedad en el ganado y otras especies animales, incluyendo el hombre (Singasa, 2017).

La glucoproteína S es importante para la entrada viral y la patogénesis; se divide en dos fracciones conocidas subunidad S1 y subunidad S2 que se acomodan en forma de pétalos con forma de picos en la superficie del virus. La secuencia de S1 presenta cierta variabilidad que produce mutaciones asociadas a la virulencia y antigenicidad de la cepa viral y es la región del genoma del BoCV que se utiliza en estudios de epidemiología moléculas de la enfermedad. La subunidad S2 en cambio, es mucho más conservada que S1 y tiene actividad de fusión con la membrana citoplasmática externa de la célula blanco (Martínez et al., 2012). Lo anterior, ha sido utilizado como referencia para el desarrollo de distintas plataformas de diagnóstico molecular para detección y diagnóstico de BoCV (Brandao et al., 2006; Liu et al., 2006; Kanno et al., 2007; Decaro et al., 2008; Martínez et al., 2012). Las técnicas RT-PCR utilizadas para la detección de BoCV

son rápidas, simples y proporcionan altos niveles de sensibilidad y especificidad. Se ha demostrado que las técnicas RT-PCR son mucho más sensibles que los sistemas ELISA y permite detectar pequeñas cantidades de virus (Betancourt et al., 2006).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ubicación

El presente estudio se realizó en la Unidad de Laboratorios de Diagnóstico (ULADI) del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y en el Laboratorio de Biología Celular de la Unidad de Ciencias de la Salud, campus Mexicali, de la Universidad Autónoma de Baja California.

2.2 Equipo básico

Termociclador BioRad a Tiempo Real con paquetería CFX Manager software, computadora y fuente de poder de 1 KVA, estación de trabajo para PCR AirClean Systems, horno de hibridación para DNA/RNA, incubadora 37 °C, baño María, centrífuga clínica, micro centrífuga 12,000 RPM, refrigerador 2-8 °C, congelador -20 °C, lámpara ultravioleta.

2.3 Equipos accesorios y consumibles de laboratorio

Pipetas de micro dilución de canal sencillo y múltiple, puntas para pipetas de microdilución, mini centrífugas, agitador vortex, gradillas, tubos y tapas para PCR, gradillas para crio-conservación, cajas para almacenamiento de muestras, refrigerantes en gel, hieleras térmicas, guantes de látex, guantes de nitrilo, lentes para laboratorio, batas de laboratorio, bolsas y contenedores para residuos peligrosos biológico infecciosos. Contenedores de muestra de 50 ml, tubos para PCR de 0.5 ml y tapas de plástico óptico.

2.4 Diseño de Oligonucleótidos para BoCV

Se diseñaron oligonucleótidos a partir de la secuencia del gen que codifica para la proteína S del coronavirus bovino cepa R-AH187, con número de acceso al *GenBank* EF424620.1. El gen corresponde a una molécula de ADN lineal de 4090 pares de bases publicada el mes de julio de 2016. Se utilizó el programa de diseño de oligonucleótidos *Primer3Plus* versión 2006-2007, que se encuentra disponible en: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>. A partir de la secuencia del gen BoCV-S se generó el oligonucleótido denominado BoCVf de banda positiva con secuencia 5'-CTACTTGGGAATAGGAGATTTG-3', mientras que para el oligonucleótido denominado BoCVr de banda negativa, la secuencia seleccionada fue 3'-TACACGGACAGAAATTTGTG-5'; la amplificación de esos oligonucleótidos por RT-PCR genera a un producto de 132 pares de bases con un contenido de GC equivalente a 36% y una temperatura de disociación de 77.0 °C para ese producto de PCR. Las características de los oligonucleótidos se muestran en el Cuadro X.

Cuadro 2.1. Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados a partir del gen de BoCV-S con referencia <i>GenBank</i> EF424620.1			
Oligonucleótido	BoCVf		
Secuencia:	CTACTTGGGAATAGGAGATTTG		
Inicio: 269	Longitud: 21 pb	Tm: 59.7 °C	GC: 38%
Oligonucleótido:	BoCVr		
Secuencia:	TACACGGACAGAAATTTGTG		
Inicio: 452	Longitud: 20 pb	Tm: 77.0 °C	GC: 40%
Producto:	132 pb		

Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó el programa Primer3Plus versión 2006-2007

2.5 Reconstitución de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por GenScript LTD. (Piscataway, NJ, USA), empacados y enviados liofilizados, los cuales fueron reconstituidos con agua grado biología molecular. Brevemente, los tubos con el liofilizado fueron centrifugados a máxima velocidad por 10 segundos; posteriormente, dentro de la campana de flujo laminar, se agregó agua grado biología molecular a cada tubo equivalente a 10 veces el valor de la concentración en nano moles (nM) referida por el fabricante para obtener una concentración estándar de 100 micro molar (μM). Los tubos fueron mezclados en vortex por 30 segundos a máxima velocidad, incubados en refrigeración a 4°C por 60 minutos y mezclados nuevamente a máxima velocidad en vortex. Para las pruebas PCR tiempo real, la concentración de trabajo de los oligonucleótidos fue establecida en 10 μM para lo cual se hizo una dilución de la mezcla de la concentración estándar 1:10 en agua grado biología molecular y almacenando en alícuotas de no más de 200 μl cada una.

2.6 Mezcla Maestra

En este trabajo se utilizó la solución de BioRad *I Script One-Step RT-PCR* (Biorad, Hercules, CA) formulada con el fluoróforo SYBR Green I en una mezcla maestra previamente optimizada que se muestra en el Cuadro X.

Cuadro 2.2. Reactivos y volumen de reacción para el RT-PCR de BoCV

Reactivo	400 nM (Una reacción)
	1 reacción

Master Mix	5 µl
DNA templete*	1 µl
Primer 1- Forward	0.5 µl
Primer 1-Reverse	0.5 µl
H ₂ O	3 µl
Volumen final	10 µl

*El ADN templete fue agregado al final en una campana de seguridad diferente

2.7 Muestras de exudado nasal

Se recolectaron 50 muestras de exudado nasal provenientes de bovinos de engorda estabulados pertenecientes a un sistema de explotación de bovinos altamente tecnificado, ubicado en el valle de Mexicali, Baja California. Los animales muestreados eran de nuevo ingreso a corrales con menos de 30 días de arribo a la explotación y contaban con 18 meses de edad en promedio. Se colectaron 20 muestras de animales aparentemente sanos, que no mostraban descarga nasal, tos, depresión o temperatura corporal menor de 38.5 °C. Este grupo de animales fue clasificado como sano. También se colectaron 30 muestras de animales que presentaban descarga nasal, tos, depresión o temperatura corporal mayor de 38.5 °C y que fueron clasificados como enfermos (Villagómez-Cortes y Martínez-Herrera, 2013). Las muestras de exudado nasal fueron colectadas por vía intranasal profunda, utilizando hisopos de dacrón tipo escobetilla. Una vez realizada la toma de muestra, la escobetilla del hisopo fue sumergida en un tubo que contenía solución salina de fosfatos (PBS) estéril, con pH 7.4: recortando el mango de tal forma que el tubo pudiera ser cerrado para proteger la muestra de posible contaminación y etiquetada con número progresivo identificando el grupo al que pertenecía. Una vez colectadas, las muestras fueron transportadas en hielera térmica con refrigerantes en gel al laboratorio para su procesamiento.

2.8 Controles positivos de ARN para BoCV

Como control positivo se utilizó ARN extraído de la fracción líquida de la vacuna Scourgard 4 K7C (Zoetis, New Jersey, USA), la cual contiene de rotavirus bovino serotipos G6 y G10 inactivados y coronavirus bovino cepa Hansen inactivado; así como *E. coli* enterotoxigénica K 99 y toxoide de *Clostridium perfringens* tipo C. El procedimiento para extracción de ARN fue aplicando el protocolo de los juegos de reactivos Bio Rad *AurumTotal RNA Fibrous Tissue* utilizando un volumen de 300 µl. El ARN extraído de la vacuna fue separado en alícuotas de 10 µl y almacenado en congelación a -20°C hasta el momento de ejecutar las pruebas RT-PCR.

2.9 Extracción de ARN de exudado nasal

Para la extracción de ARN de las muestras de exudado nasal provenientes de bovinos de engorda, se utilizaron los juegos de reactivos Bio Rad *AurumTotal RNA Fibrous Tissue*. Brevemente, los hisopos con exudado nasal sumergidos en solución PBS, fueron centrifugados a 5000 x G por 10 minutos. Del sobrenadante, se tomaron 100 µl para la extracción de ARN y 100 µl mezclados con 1 ml de reactivo *purezol* y homogenizado con en disruptor ultrasónico; después de incubar en hielo por 5 minutos se agregaron 0.2 ml de cloroformo agitando la muestra manualmente por 15 segundos y dejando incubar por 5 minutos a temperatura ambiente para posteriormente centrifugar a 12 000 x G por 15 minutos a 4 °C. Este proceso separa la mezcla en 3 fases: Una superior, la fase acuosa, una interface blanca y una fase roja llamada fase orgánica, sin remover las fases se transfiere la fase acuosa que contiene el ARN a un tubo Ependorf; posteriormente se agregan 600 µl de etanol y se mezcla por pipeteo. Posteriormente se agregan 700 µl de la muestra del RNA y se pasan a la columna de afinidad, se centrifuga por 60 segundos a 12 000 x G, se retira la columna y se descarta el sobrenadante, repitiendo el proceso hasta agotar la fase acuosa producida en el paso anterior. En seguida se agregan 700 µl de solución de lavado de baja astringencia y se

centrifuga a 12 000 x G por 1 min descartando el sobrenadante. Para eliminar cualquier cantidad de DNA remanente, se agregan 80 µl de DNAsa, incubando por 15 minutos a temperatura ambiente, para luego agregar 700 µl solución de lavado de alta astringencia seguido de centrifugación a 12 000 x G por 1 minuto y descartando el sobrenadante. Después de repetir los lavados y de agregar un paso de centrifugación adicional a 12000 x G por 1 minuto para eliminar residuos de las soluciones de lavado, se recupera el ARN con 50 µl de solución de elución, centrifugando a 12 000 x G por 1 minuto. El ARN extraído almacenado en congelación a -20 °C hasta el momento de las pruebas RT-PCR.

2.10 Protocolos de pruebas RT-PCR

Los oligonucleótidos y protocolos utilizados en las pruebas RT-PCR de este proyecto fueron diseñados, desarrollados e instrumentados por investigadores del CADE-IICV-UABC siguiendo los lineamientos y recomendaciones publicados en revistas científicas indizadas, el manual de operación del sistema CFX de BioRad y las herramientas de bioinformática para manipulación de genes disponibles por el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) de los Estados Unidos. Los parámetros de desnaturalización, hibridación y extensión fueron calculados empleando la herramienta *Protocol Autowriter* de la paquetería CFX96, tomando en consideración el tamaño del producto del PCR, la secuencia de los oligonucleótidos y el tipo de enzima de la mezcla maestra, resultando en un ciclo de 95°C durante 3 minutos, seguido de 39 ciclos de 10 segundos de desnaturalización a 95°C, 20 segundos de hibridación a 51.0°C y un ciclo final de extensión de 15 segundos a 72°C. Asimismo, para cada corrida se realizó el análisis de curva de disociación a partir de 65°C y hasta 95°C para la identificación de curvas de amplificación dentro de la temperatura estimada de 77.0°C +/- 1°C del producto del PCR de 132 pb y discriminar entre artefactos distintos a la amplificación del templete de ADN esperado.

2.11 Interpretación de resultados

Los resultados de las pruebas RT-PCR para BoCV fueron considerados positivos cuando la muestra correspondiente obtuvo una señal fluorescente de amplificación antes del ciclo 40, por encima de la línea umbral de control que el programa CFX96 establece de manera automática y que corresponde a 10 veces la desviación estándar del promedio de índice de fluorescencia generada por todas las muestras durante los 10 primeros ciclos de cada corrida. Los resultados fueron considerados negativos cuando la muestra correspondiente no logre desarrollar una señal fluorescente de amplificación por encima de la línea umbral del control negativo de referencia en un máximo de 40 ciclos.

III. RESULTADOS

3.1 Estandarización del RT-PCR para BoCV

El gráfico de amplificación y la curva de disociación calculados por el CFX96 de *BioRad* para el sistema RT-PCR para BoCV demostraron que la combinación óptima de reactivos para obtener la máxima amplificación de los oligonucleótidos BoCVf y BoCVr se logra al emplearlos a una concentración de 400 nM con 2 µl de ARN template, activando la transcriptasa reversa de 50 °C por 10 minutos para convertir el ARN en ADN, para posteriormente aplicar un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C durante 5 minutos, seguido de 45 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 95 °C, 30 segundos de hibridación a 60.2 °C y un ciclo final de extensión de 30 segundos a 72 °C. Bajo estas condiciones los controles positivos extraídos de la vacuna Scourguard 4 K/C y negativos para BoCV fueron probados por cuadruplicado, desarrollando una señal por encima de la línea umbral (Cq) con un promedio de 31.09 ciclos en 40 ciclos totales en cada corrida de amplificación (Figura 1). Asimismo, la curva de disociación (*Melt Peak*) para el ARN control positivo mostró un rango de temperatura de disociación entre 76.0 °C y 78.0 °C, con una temperatura promedio de 77.0 °C (Figura 2).

3.2 Resultados del RT-PCR para muestras de sangre

Se probaron por duplicado 50 muestras de ARN proveniente de exudado nasal de bovinos de engorda estabulados de las cuales 19 (38.0 %) lograron una amplificación por encima de la línea umbral que establece el software CFX96 y por lo tanto fueron consideradas como positivas (Cuadro 1.). El Cq promedio de este grupo de muestras fue de 34.60 ciclos con un rango Cq entre 30.87 y 35.95 ciclos y Tm promedio de 77.0°C (Figura 3).

Cuadro 3.1. Resultados generales del RT-PCR para BoCV de bovinos de engorda estabulados con síntomas y sin síntomas de enfermedad respiratoria

Animales	n	RT-PCR Positivo a BoCV
Con síntomas de enfermedad respiratoria*	30	5 (16.67%)
Sin síntomas de enfermedad respiratoria	20	14 (70.0%)
Total	50	19 (38.0%)

*Clasificados como enfermos por el Médico Veterinario Zootecnista de la explotación y que mostraban descarga nasal, tos, depresión o temperatura corporal mayor de 38.5 °C.

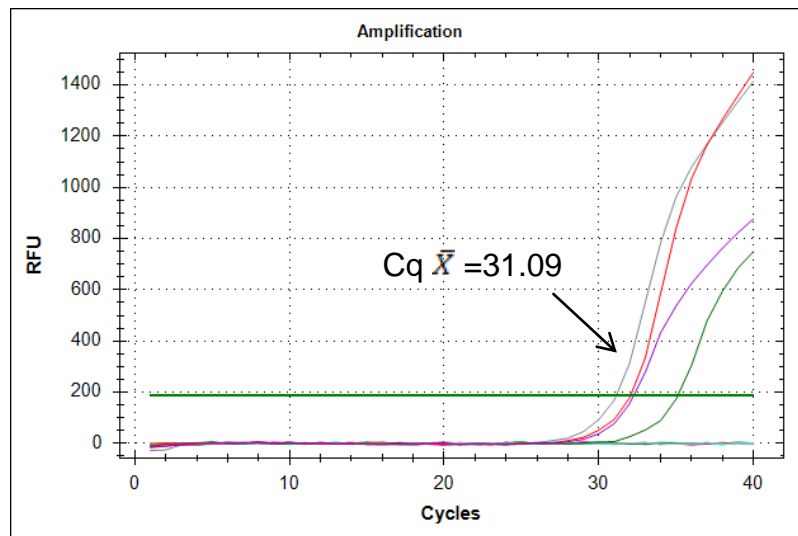


Figura 3.1. Curva de amplificación de los controles de BoCV extraídos de la vacuna Scourguard 4 K/C utilizando los oligonucleótidos BoCVf y BoCVr a una concentración de 400 nM con 2 µl de ARN template.

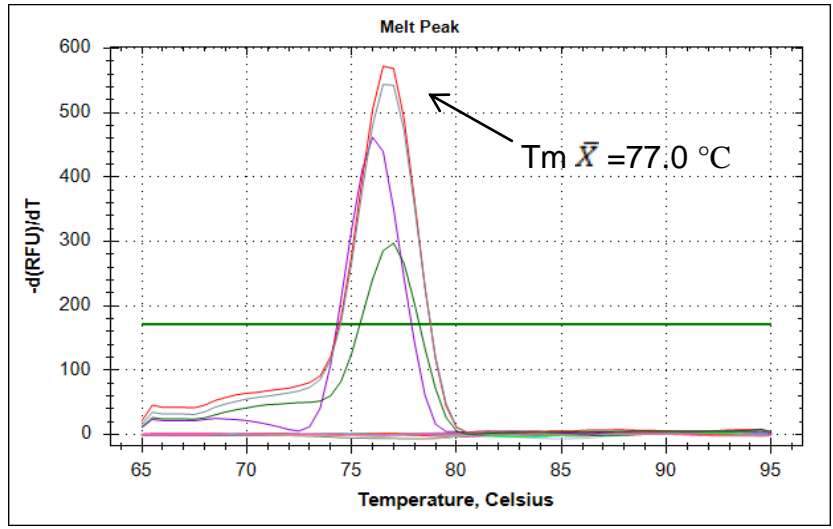


Figura 3.2. Curva de disociación (T_m) de los controles positivos del RT-PCR para BoCV mostrando una temperatura promedio de 77.0 °C.

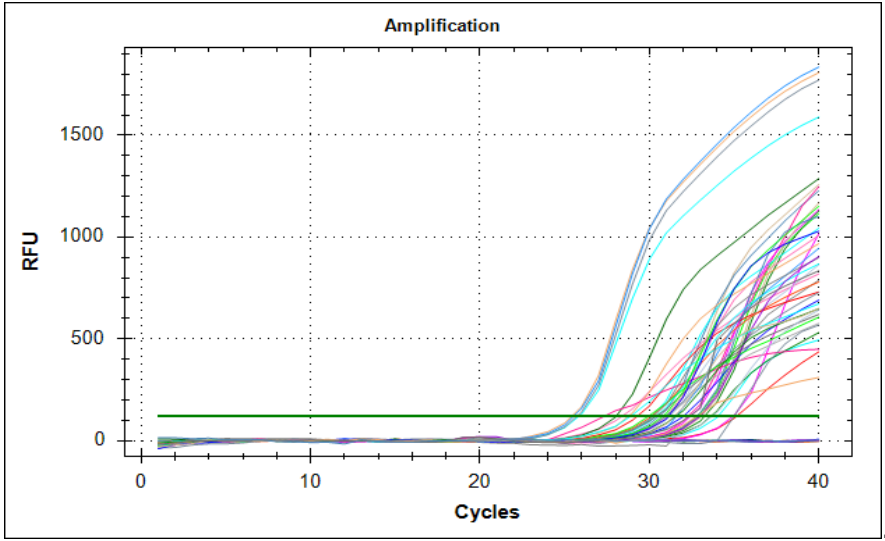


Figura 3.3. Curva de amplificación en muestras de exudado nasal probadas por el sistema RT-PCR para BoCV.

IV. DISCUSIÓN

El BCoV se reconoce como un virus patógeno de distribución mundial que produce enfermedades entéricas en becerros jóvenes (diarrea neonatal de terneros) y en bovinos adultos (disentería de invierno). El BoCV también está implicado en las infecciones del tracto respiratorio de becerros en crecimiento y como causa importante de fiebre de embarque en ganado de engorda. Aunque las infecciones por BoCV producen una mortalidad menor al 1-2%, la morbilidad de este virus puede alcanzar el 100% de los animales de una explotación, ocasionando síndromes respiratorios o digestivos que afectan de forma negativa la tasa de ganancia de peso o de producción de leche, además de los costos asociados a servicios veterinarios, antibióticos y otros medicamentos; que en conjunto ocasionan pérdidas económicas para el productor pecuario (Amer et al., 2014; Oma et al., 2016).

El presente trabajo tiene como objetivo el desarrollo y la instrumentación de una plataforma RT-PCR que utiliza un juego de oligonucleótidos que detectan y amplifican un fragmento del gen que codifica para la proteína S del BoCV en un termociclador a tiempo real y paquetería CFX96 de Bio Rad que utiliza una mezcla de un solo paso, resultando en una plataforma de diagnóstico molecular altamente sensible y específica para la detección de BoCV a partir de muestras de exudado nasal. La proteína S es el componente estructural que el BoCV utiliza para fusionarse con la membrana citoplasmática externa de la célula blanco para iniciar el proceso de infección. En ese sentido, distintos fragmentos del gen que codifica para la proteína S han sido utilizado como base metodológica de referencia para el desarrollo de distintas plataformas de diagnóstico molecular para la detección y diagnóstico de BoCV de forma rápida y con altos niveles de sensibilidad y especificidad, incluso en muestras que contienen pequeñas cantidades de virus (Brandao et al., 2006; Liu et al., 2006; Kanno et al., 2007; Decaro et al., 2008; Martínez et al., 2012).

El desarrollo y la instrumentación de la plataforma RT-PCR para BoCV que aquí se reporta, surge como respuesta a necesidad de herramientas de diagnóstico confiables, precisas y rápidas para detectar una enfermedad ha sido reportada como parte del complejo respiratorio bovino pero que debido a la gran cantidad de signos y síntomas que producen el grupo de agentes patógenos asociados al CRB por si solos no proporcionan evidencia suficiente para establecer con precisión cuál es el agente causal al que puede atribuirse el estado patológico de un animal (Fulton et al., 2016); especialmente cuando el proceso infeccioso se desarrolla con síntomas mínimos o imperceptibles, ocasionando retraso en la iniciación de la terapia correspondiente, extendiendo en el tiempo requerido para recuperar el estado de salud y como consecuencia afectando de forma negativa los niveles de productividad de los animales enfermos (Bok et al., 2015; Ribeiro et al., 2016).

El lote de 50 muestras de exudado nasal analizadas por la plataforma RT-PCR para BoCV provenía de animales clasificados como enfermos ($n = 30$) y aparentemente sanos ($n = 20$) de acuerdo con el sistema de calificación para animales enfermos de ese sistema de explotación de bovinos, el cual incluye una serie de signos y síntomas clínicos asociados al CRB y reportados en la literatura (Villagómez-Cortés y Martínez-Herrera, 2013; Wolfger et al., 2015). Los resultados obtenidos con la plataforma RT-PCR para BoCV muestran que 19 de ellas resultaron positivas para una prevalencia estimada de 38%. Sobresale el hecho que 5/30 de las muestras provenientes del grupo de animales enfermos resultaron positivas a las pruebas, mientras que de las muestras provenientes del grupo de animales aparentemente sanos, 14/20 resultaron positivas a las pruebas. Contrario a lo que se anticipaba, el 70% de los animales del grupo de animales aparentemente sanos resultó positivo a la plataforma RT-PCR para BoCV. Lo anterior puede deberse a la sensibilidad analítica de la plataforma RT-PCR empleada en este estudio, calculada por el fabricante del equipo (BioRad) en 10 o menos equivalentes genómicos por reacción. Tomando en consideración que

muchas de las pruebas resultaron con un Cq superior a los 30 ciclos, es de suponer que las cargas virales eran relativamente bajas en ese grupo de muestras/animales, lo que supone que esos animales fueron capaces de desarrollar una respuesta inmune lo suficientemente potente como para mantener las cargas virales dentro de los límites de infección sin llegar a producir patología con los signos y síntomas característicos de la infección con el BoCV. Lo anterior tiene fundamento en el hecho que las proteínas M y E del BoCV y otros coronavirus como el virus de la gastroenteritis transmisible son potentes inductores de síntesis de interferon alfa (IFN- α) en linfocitos de sangre periférica. El IFN- α posee propiedades pro-inflamatorias comunes con el Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 1 (IL-1). El IFN- α actúa de forma sinérgica con el TNF- α y con la IL-1 y cada uno de ellos promueve la expresión de los otros resultando en la infiltración de neutrófilos en el pulmón lo que teóricamente contribuye a la protección del órgano o al control de la patogenia de la enfermedad (Van Reeth y Nauwynck, 2000).

Este estudio amplía el conocimiento de los virus asociados con el CRB en la región ganadera correspondiente al noroeste de México ya que es la primera vez que se reporta la presencia del BoCV a través de la identificación y amplificación de una parte de su genoma resultando en una prevalencia del 39.0% y colocando al BoCV en la segunda posición de la tabla de prevalencia de virus asociados al CRB detectados en la zona en un estudio previo, donde el virus sincitial respiratorio (VSRB) ocupó la primera posición con 80.6% de prevalencia, seguido del virus de parainfluenza 3 (PI3) con 23.8%, herpes virus bovino 1 (IBR) con 20.4% y virus de diarrea viral bovina (DVB) con 11.3% (Rodríguez-Castillo et al., 2016).

La prevalencia de 39% obtenida en este trabajo para BoCV es similar a la reportada en otras regiones del mundo. En un estudio realizado en Australia sobre CRB en ganado de engorda de exportación a partir de muestras de exudado nasal y analizadas empleando plataformas RT-PCR, se encontró una prevalencia de

40.1% para BoCV, seguido de 0.4% para DVB, 0.3% para IBR, 0.3% para VSRB y 0.3% para PI3, haciendo evidente la magnitud de la influencia del BoCV sobre la presentación de enfermedad respiratoria (Moore et al., 2014). Asimismo, nuestros resultados son superiores a los reportados en Irlanda, donde se realizó un estudio para establecer la prevalencia de agentes patógenos asociados al CRB a partir de muestras de exudado nasal y empleando RT-PCR, encontrando una prevalencia de 22.9% para BoCV, seguido de VSRB con 11.6%, OI3 con 7.0%, IBR con 6.1% y DVB con 5%, destacando el hecho que el BoCV es el virus asociado al CRB que más frecuentemente es identificado y amplificado en el ganado de engorda de ese país (O'Neill et al., 2014).

En los Estados Unidos de América, el BoCV es el virus asociado al CRB con mayor prevalencia en ganado de engorda. Los reportes de prevalencia de patógenos asociados al CRB en muestras de exudado nasal provenientes de ganado de engorda y analizadas por técnicas RT-PCR reportan una prevalencia de 62.8% para BoCV, seguido de DVB con 15.7%, IBR con 14.9%, VSRB con 9.1% y 8.3% para PI3 (Fulton et al., 2016). Los reportes de prevalencia en ese país superan los obtenidos en Australia, Irlanda y en este trabajo, lo cual puede deberse que las explotaciones de bovinos en los Estados Unidos pueden alojar cientos de miles de cabezas de ganado en una región determinada, donde el contacto cercano entre animales sanos y enfermos puede favorecer la transmisión y persistencia del BoCV entre el ganado (Wolfger et al., 2015).

Como se ha mencionado en este trabajo, el BoCV se reporta frecuentemente como patógeno asociado al CRB en ganado de engorda estabulado. Las estrategias de control actuales para el BoCV incluyen vacunas comerciales que contienen virus vivo modificado o preparaciones con virus muerto, sin embargo; las vacunas actuales para BoCV están diseñadas para el control de enfermedades entéricas en neonatos o animales jóvenes o aplicadas en vacas gestantes para producir anticuerpos que serán transmitidos de forma pasiva a través del calostro o leche y reducir en riesgo de transmisión de BoCV en

neonatos. La eficacia de las vacunas disponibles en el mercado requiere de más estudios para establecer la capacidad de proteger contra la forma respiratoria de la enfermedad, con énfasis en la efectividad de la protección conferida no solo en animales jóvenes sino también en animales adultos tanto para la forma entérica como respiratoria de la enfermedad (Fulton et al., 2011).

V. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que el BoCV se encuentra presente en el ganado estabulado de los sistemas de explotación de bovinos de engorda del valle de Mexicali, Baja California.

La plataforma RT-PCR para BoCV aquí desarrollada es una herramienta de diagnóstico molecular rápida, sensible y específica para detectar el BoCV en muestras de exudado nasal proveniente de ganado de engorda estabulado.

La prevalencia de 38.0% para BoCV en ganado de engorda estabulado reportada en este trabajo debe ser el punto de partida para futuras investigaciones del papel que juega este virus en la presentación del CRB en los sistemas de explotación de bovinos de engorda de la región.

Es de la mayor importancia contar con vacunas que confieran protección contra la forma respiratoria de la infección por BoCV por lo que se requiere de estudios encaminados al desarrollo y validación de las mismas con cepas locales o regionales.

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

Belak, S. Molecular diagnosis of viral diseases, present trends and future aspects
A view from the OIE Collaborating Centre for the Application of Polymerase Chain
Reaction Methods for Diagnosis of Viral Diseases in Veterinary Medicine. 2007.
Vaccine, Vol. 25, No. 30, pp. 5444-52.

Betancourt, A., Edisleidy Rodríguez, R. Joa, J.A. Ancizar, A. López, Damaris
Relova y Maritza Barrera. (2009). ENTEROPATOGENICIDAD DE UNA CEPA DE
CORONAVIRUS BOVINO. *Rev Salud Anim.* v.31 n.1 La Habana ene.-abr.

Betancourt A, E Rodríguez, M Barrera. (2005). Disenteria de invierno:
reconocimiento, diagnóstico y control. *Redvet* 6, 1-8.

Betancourt A, E Rodríguez, R Joa, JA Ancizar, M Barrera. (2005). Reproducción
experimental de diarreas con Coronavirus bovino en terneros recién nacidos
privados de calostro. *Rev Salud Anim* 27, 171-175.

Betancourt, Martell, Alexander, Rodríguez, Batista, Edisleidy, Barrera, Valle y
Maritza. (2006). Coronavirus bovino: Infecciones neumointerísticas (Bovine
coronavirus: Neumoenteric infections). *REDVET* ISSN 1695-7504.

Bok M, Miño S, Rodriguez D, Badaracco A, Nuñez I, Souza SP, Bilbao G, Louge
Uriarte E, Galarza R, Vega C, Odeon A, Saif LJ, Parreño V.(2015). Molecular and
antigenic characterization of bovine Coronavirus circulating in Argentinean cattle
during 1994-2010. *Vet Microbiol.* Dec 31;181(3-4):221-9.

Booker, C.W., et al., Microbiological and histopathological findings in cases of fatal bovine respiratory disease of feedlot cattle in Western Canada. *Can Vet J*, (2008). 49(5): p. 473-81.

Catroxo, M. H. B.; Miranda, L.B.; Lavorenti, A.; Petrella, S.; Melo, N. A.; Martins, A. M. C. P. R. F. (2010). Detection of Coronavirus in Capybaras (*Hydrochoeris hydrochaeris*) by Transmission Electron Microscopy in São Paulo, Brazil Detección de Coronavirus in Capybaras (*Hydrochoeris hydrochaeris*) por Microscopía Electrónica de Transmisión en São Paulo, Brasil *Int. J. Morphol.*, 28(2):549-555.

Cercciaro N. White BJ, Renter DG, Babcock AH, Kelly L, Slattery R. (2012). Associations between the distance traveled from sale barns to commercial feedlots in the United States and overall performance, risk of respiratory disease, and cumulative mortality in feeder cattle during 1997 to 2009. *J anim Sci*, Jun;90(6); 1929-39. Doi:10.2527/jas.4559 Epub.

Fulton, R.W., d'Offay, J.M., Landis, C., Miles, D.G., Smith, R.A., Saliki, J.T., Ridpath, J.F., Confer, A.W., Neill, J.D., Eberle, R., Clement, T.J., Chase, C.C., Burge, L.J. & Payton, M.E. (2016). Detection and characterization of viruses as field and vaccine strains in feedlot cattle with bovine respiratory disease. *Vaccine*, Vol. 34, No. 30, pp. 3478-92.

Gulliksen SM, E Jor, KI Lie, IS Hamnes, T Loken, J Akerstedt, O Osteras. (2009). Enteropathogens and risk factors for diarrhea in Norwegian dairy calves. *J Dairy Sci* 92, 5057-5066.

H.M. Amer, A. Abd El Wahed, M.A. Shalaby, F.N. Almajhdi, F.T. Hufert, M. Weidman. (2014). A new approach for diagnosis of bovine coronavirus using a reverse transcription recombinase polymerase amplification assay *Journal of Virological Methods*. 193 (2013) 337–340.

Haitham M. Amer, Fahad N. Almajhdi. (2011). Development of a SYBR Green I based real-time RT-PCR assay for detection and quantification of bovine coronavirus. *Molecular and Cellular Probes* 25 101e107.

Haitham M. Amer. Fahad N. Almajhdi. (2011). Development of a SYBR Green I based real-time RT-PCR assay for detection and quantification of bovine coronavirus. Volume 25, Issues 2–3, Pages 101-107.

Izzo, M.M., Kirkland, P.D., Mohler, V.L., Perkins, N.R., Gunn, A.A. & House, J.K. Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Aust Vet J*, Vol. 89, No. 5, pp. 167-73.

Johannes Stors, Xiaoqing, Charles W. Purdy, Chouljenko, Konstantin G. Kousoulas, Frederick M. Enright, Williams C. Gilmore, Robert E. Briggs, and Raymond W. Loan. (2000). Coronavirus and Pasteurella Infection in Bovine Shipping Fever Pneumonia and Evans Criterial for Causation. Vol 38 no. 9 3291-3298.

Juliane Ribeiro, Elis Lorenzetti, Alice Fernandes Alfieri, Amauri Alcindo Alfieri.(2016). 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.

L. J. Saif. (2010). “Bovine Respiratory Coronavirus,” *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, vol. 26, no. 2, pp. 349–364.

Lai MMC, S Perlman, LJ Anderson. (2007). Coronaviridae. In: Knipe DM.; Howley, PM. *Fields virology*, 5th ed. Vol 2. Lippincott Williams & Wilkins, Massachusetts, USA, Pp 1305- 1335.

Lisa Mullis, Linda J. Saif, Yongbin Zhang, Xuming Zhang, Marli S.P. Azevedo. (

2012). Stability of bovine coronavirus on lettuce surfaces under household refrigeration conditions. *Food Microbiology* 30 180e186.

Liu, S. Hägglund, M. Hakhverdyan, S. Alenius, L.E. Larsen, S. Belák Molecular epidemiology of bovine coronavirus on the basis of comparative analyses of the S gene. *J. Clin. Microbiol.*, 44 (2006), pp. 957-960

M. Bok, S. Miño, D. Rodriguez, A. Badaracco, I. Nuñez, S.P. Souza, G. Bilbao, E. Louge Uriarte, R. Galarza, C. Vega, A. Odeon, L.J. Saif, V. Parreño. (1994–2010) Molecular and antigenic characterization of bovine Coronavirus circulating in Argentinean cattle during. *Veterinary Microbiology*. 181 (2015) 221–229.

MacLahlan NJ, EJ Dubovi. (2011). Coronaviridae. In: MacLahlan NJ, Dubovi EJ. (eds). *Fenner's Veterinary Virology*, 4th ed. Elsevier Inc, London, UK, Pp 393-413.

Martínez Moreno Nadia.(2012). Análisis molecular y filogenético basado en el gen de la glicoproteína de la espícula (S) de coronavirus bovino Molecular. *Rev. Salud Anim.* Vol. 34 No. 3, 02.

Martinez, N., Brandao, P.E., de Souza, S.P., Barrera, M., Santana, N., de Arce, H.D. & Perez, L.J. Molecular and phylogenetic analysis of bovine coronavirus based on the spike glycoprotein gene. *Infect Genet Evol*, Vol. 12, No. 8, pp. 1870-8.

Moore, S.J., O'Dea, M.A., Perkins, N. & O'Hara, A.J. Estimation of nasal shedding and seroprevalence of organisms known to be associated with bovine respiratory disease in Australian live export cattle. *J Vet Diagn Invest*, (2014). Vol. 27, No. 1, pp. 6-17. DOI: <https://doi.org/10.1177/1040638714559741>

Mullis L, Saif LJ, Zhang Y, Zhang X, Azevedo MS.(2012). Stability of bovine coronavirus on lettuce surfaces under household refrigeration conditions. *Food Microbiol.* 30(1):180-6.

N. Decaro, V. Mari, C. Desario, M. Campolo, G. Elia, V. Martella, G. Greco, F. Cirone, M.L. Colaianni, P. Cordioli, C. Buonavoglia. Severe outbreak of bovine coronavirus infection in dairy cattle during the warmer season. *Vet. Microbiol.*, 126 (2008), pp. 30-3

Nicola Decaro, Gabriella Elia, Marco Campolo, Costantina Desario, Viviana Mari, Arianna Radogna, Maria Loredana Colaianni, Francesco Cirone, Maria Tempesta, Canio Buonavoglia. (2008). Detection of bovine coronavirus using a TaqMan-based real-time RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods* 151 (2008) 167–171.

Nicola Decaro, Vito Martella, Gabriella Elia, Marco Campolo, Viviana Mari, Costantina Desario, Maria Stella Lucente, Alessio Lorusso, Grazia Greco, Marialaura Corrente, Maria Tempesta, Canio Buonavoglia. (2007). Biological and genetic analysis of a bovine-like coronavirus isolated from water buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. *Virology* 370 213–222.

O'Neill, R., Mooney, J., Connaghan, E., Furphy, C. & Graham, D.A. (2014). Patterns of detection of respiratory viruses in nasal swabs from calves in Ireland: a retrospective study. *Vet Rec*, Vol. 175, No. 14, pp. 351.

Ohlson, A., Heuer, C., Lockhart, C., Traven, M., Emanuelson, U. & Alenius, S. Risk factors for seropositivity to bovine coronavirus and bovine respiratory syncytial virus in dairy herds. 2010. *Vet Rec*, Vol. 167, No. 6, pp. 201-6.

Oma, V. S., Tråvén, M., Alenius, S., Myrmel, M., & Stokstad, M. (2016). Bovine coronavirus in naturally and experimentally exposed calves; viral shedding and the

potential for transmission. *Virology Journal*, 13, 100. <http://doi.org/10.1186/s12985-016-0555>

P.E. Brandão, F. Gregori, L.J. Richtzenhain, C.A.R. Rosales, L.Y.B. Villarreal, J.A. Jerez. Molecular analysis of Brazilian strains of bovine coronavirus (BCoV) reveals a deletion within the hypervariable region of the S1 subunit of the spike glycoprotein also found in human coronavirus OC43. *Arch. Virol.*, 151 (2006), pp. 1735-1748.

Rodríguez-Castillo José Luis, López-Valencia Gilberto, Monge-Navarro Francisco Javier, Medina-Basulto Gerardo Enrique, Hori-Oshima Sawako, Cueto-González Sergio Arturo, De La Mora-Valle Alfonso, Muñoz-Del Real Luis Mario, Tinoco-Gracia Luis, Rentería-Evangelista Tomás Benjamín. Detection and economic impact related to bovine respiratory disease, shrink, and traveling distance in feedlot cattle in Northwest Mexico. *Turk J Vet Anim Sci*, (2016) 40: TÜBİTAK, doi:10.3906/vet-1603-9

Sanjay Kapil, Kay L. Richardson, Trisha R. Maag, Sagar M. (1999). Goyal Characterization of bovine coronavirus isolates/from eight different states in the USA. *Veterinary Microbiology* 67 221±230.

Santibáñez Contreras Daniel. (2012). Diagnóstico de Coronavirus Bovino mediante técnicas moleculares a partir de heces de terneros en dos lecherías de la provincia del rancho en Chile.

Selles Sidi Mohammed Ammar, Kouidri Mokhtaria, Belhamiti Belkacem Tahar, Ait Amrane Amar, Benia Ahmed Redha, Bellik Yuva, Hammoudi Si Mohamed, Niar Abdellatif, Boukrâa Laid' (2014). Prevalence of rotavirus (GARV) and coronavirus (BCoV) associated with neonatal diarrhea in calves in western Algeria. *Asian Pac J Trop Biomed* 4(Suppl 1): S318-S322.

Singasa, K., Songserm, T., Lertwatcharasarakul, P. & Arunvipas, P. Molecular and phylogenetic characterization of bovine coronavirus virus isolated from dairy cattle in Central Region, Thailand. 2017. *Trop Anim Health Prod*.

T. Kanno, S. Hatama, R. Ishihara, I. Uchida Molecular analysis of the S glycoprotein gene of bovine coronaviruses isolated in Japan from 1999 to 2006. *Gen. Virol.*, 88 (2007), pp. 1218-1224.

Tan YJ, SG Lim, W Hong. (2007). Regulation of cell death during infection by the severe acute respiratory syndrome coronavirus and other coronaviruses. *Cell Microbiol* 9, 2552-2561.

Van Reeth K., Nauwynck H. Proinflammatory cytokines and viral respiratory disease in pigs. *Vet. Res.* 2000;31:187–213.

Villagomez-Cortes, J. A. & Martínez-Herrera, D. I.. Epidemiological evaluation of clinical bovine respiratory disease complex in a tropical Mexican feedlot. *Res Opin Anim Vet Sci* 3, (2013), 315–321.

Wolfger, B., Timsit, E., White, B. J., and Orsel, K. A Systematic Review of Bovine Respiratory Disease Diagnosis Focused on Diagnostic Confirmation, Early Detection, and Prediction of Unfavorable Outcomes in Feedlot Cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 31(3), (2015), 351-65.