

Comunicación corta
**AISLAMIENTO DE CORONAVIRUS BOVINO POR PRIMERA
VEZ EN CUBA**

A. Betancourt*, Edisleidy Rodríguez, Damarys Relova** y Maritza Barrera****

**Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Agraria de la Habana (UNAH), San José de las Lajas, La Habana, Cuba; **Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. Correo electrónico: martell@isch.edu.cu*

RESUMEN: Se lograron aislamientos virales en cultivos primarios de riñón de terneros, identificados como Coronavirus bovino por seroneutralización con suero hiperinmune específico. Las muestras empleadas fueron heces fecales, obtenidas a partir de vacas lecheras que padecieron un cuadro clínico semejante a disentería de invierno. Estas muestras fueron seleccionadas por su capacidad de aglutinar eritrocitos de hámster con inhibición de la hemoaglutinación por suero hiperinmune específico de Coronavirus bovino.

(Palabras clave: Coronavirus bovino; aislamiento; disentería de invierno)

ISOLATION OF BOVINE CORONAVIRUS FOR THE FIRST TIME IN CUBA

ABSTRACT: Faecal samples were tested for bovine coronavirus by means of agglutination of hamster erythrocytes and hemagglutination inhibition. Isolation of bovine coronavirus was carried out in monolayers of primary culture of calf kidney, using faecal samples from dairy cows with clinical signs similar to winter dysentery. When isolated, they were submitted to seroneutralization with anti-bovine coronavirus serum. These isolates were confirmed to be positive, once being neutralized.

(Key words: Bovine coronavirus; isolation; winter dysentery)

Coronavirus bovino (BCoV) es un virus ARN, de simple cadena, con polaridad positiva (25), de morfología esférica, envuelto y con un diámetro de aproximadamente 120 nm (7).

Este virus está ubicado taxonómicamente en el orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae* y género *Coronavirus* (9) y clasifica en el segundo grupo filogenético de los tres en que se dividen los coronavirus (14,6,19).

BCoV fue aislado por primera vez, a partir de terneros que padecían del síndrome diarreico neonatal del ternero (16); años después, se logró el aislamiento del virus de bovinos adultos con disentería de invierno (11) y más recientemente se aisló de vacas con fiebre de embarque (20).

En la actualidad BCoV es considerado un importante agente patógeno, causante de enfermedades neumoentéricas del ganado bovino en muchos países (10,8,22,12,15). En Cuba, este virus fue detectado por primera vez en muestras de heces fecales de vacas lecheras que padecieron un cuadro clínico semejante a disentería de invierno, a través de los ensayos de hemoaglutinación, reacción en cadena de la polimerasa y la reproducción experimental del cuadro diarreico en terneros inoculados experimentalmente (1,3,4). El objetivo del presente trabajo es lograr el aislamiento de BCoV para confirmar el diagnóstico inicial.

Se emplearon 65 muestras de heces fecales, colectadas de vacas lecheras que presentaron signos clínicos semejantes a disentería de invierno, en fase

aguda de la enfermedad y recuperadas. Los animales pertenecían a diferentes vaquerías de 12 provincias de Cuba. Estas muestras fueron sometidas a diagnóstico de laboratorio para BCoV por aglutinación de eritrocitos de hámster e inhibida la hemoaglutinación por suero hiperinmune de BCoV, de acuerdo con el método descrito por Brandao *et al.* (5). Posteriormente las muestras se redujeron a 12 mezclas de heces fecales, las cuales fueron procesadas para el aislamiento viral. Se tomó 1g de cada mezcla de heces fecales y se diluyó en 9 mL de medio de cultivo de células de mamífero, DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium) Sigma-Aldrich Suiza, suplementado con antibiótico 5X [penicilina (500 000 U/mL) estreptomycin (0.5g/mL) y fungizona (5mg/mL)]. Seguidamente, se realizó la preparación de las muestras en homogenizador de vidrio hasta su total disgregación. Los homogenados fueron clarificados por centrifugación durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante fue filtrado por una membrana de acetato de celulosa de 0.45 µm (Centrisart, Sartorius).

El aislamiento se realizó en cultivo primario de riñón de ternero (CPRT) crecidos en monocapas de placas de 24 pozos (para cultivos celulares estériles, NUNC) inoculando tres pocillos por cada muestra con 200 µL de la muestra y 300 µL de medio de cultivo DMEM, suplementado para aislamiento viral con 0.85 g/L de NaHCO₃, y antibióticos 1X, HEPES 0.01 M y Tripsina 0.125%. De cada placa se dejaron pocillos como control de células sin inocular, a los cuales se les adicionó 500 µL de medio de cultivo suplementado para aislamiento viral. Después de una hora de incubación a 37°C en atmósfera húmeda de CO₂ al 5% se le retiró el inóculo y se lavó con solución salina tamponada con fosfato pH 7.2 (PBS), se adicionó a cada pozo 1 mL de DMEM suplementado para aislamiento viral. Finalmente, las placas permanecieron a 37°C en atmósfera húmeda de CO₂ al 5% durante siete días de observación diaria al microscopio invertido.

Los aislados se identificaron por seroneutralización, con el empleo del procedimiento α (suero constante/virus variable). Para esto se utilizó un suero hiperinmune de BCoV obtenido en conejos con la cepa Kakegawa, donada por el Dr. Paulo Brandao, del Instituto Pasteur, Sao Paulo, Brasil. El procedimiento para la obtención del suero se describe a continuación: Inicialmente a los animales se les aplicó 1 mL de sobrenadante de cada suspensión viral, con un título de 10^{6.5} DICT₅₀/mL empleando la vía intravenosa y a los siete días se aplicó por vía intramuscular (en el cuadriceps femoral) 1 mL del virus concentrado por ultracentrifugación a 33 000 g por 1.5 h y adyuvado volumen a volumen con

adyuvante completo de Freund. A los 14 días de la segunda inoculación se aplicó una dosis de recuerdo en condiciones similares pero utilizando adyuvante incompleto de Freund. A los 42 días post-inoculación se realizó la eutanasia después de la insensibilización de los animales con cloroformo y el desangrado por punción de la vena marginal de la oreja. El suero se evaluó por seroneutralización según describe Jerez *et al.* (13).

La seroneutralización se desarrolló según el procedimiento descrito por Jerez *et al.* (13). Se hicieron diluciones de base, 10 de los aislados a identificar en microclapas de 96 pozos. En triplicados los aislados fueron diluidos en medio DMEM suplementado para aislamiento viral, desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁸ para su titulación por punto final. En otras placas se realizó el procedimiento de forma similar y los aislados se enfrentaron al suero hiperinmune anti-BCoV en una dilución donde neutraliza 100 DICT₅₀ de la cepa Kakegawa. Se consideró como aislados positivos para BCoV, los que presentaron un decrecimiento del título infectivo DICT₅₀ de dos o más logaritmos, entre la titulación y la seroneutralización.

Se logró aislar BCoV a partir de las doce mezclas de heces fecales evaluadas, tanto de muestras obtenidas de animales en fase aguda como de animales recuperados de la enfermedad (Tabla 1).

La multiplicación viral en CPRT se evidenció por la observación de efecto citopatogénico. El efecto se caracterizó por alargamiento celular, seguido de la agrupación de células con varios núcleos. A partir de las 48-72 horas post-inoculación se observó la formación de sincitios. Alrededor de las 96 horas post-inoculación se comenzó un desprendimiento celular, que concluyó con la degeneración de la monocapa celular en un periodo de tiempo de aproximadamente 120 horas (Figura 1).

Las células empleadas como controles permanecieron sin alteraciones ostensibles durante el tiempo de observación, por lo que las alteraciones descritas se atribuyeron a la presencia de virus.

Estos eventos celulares descritos en la multiplicación viral en CPRT, coinciden con los observados al aislar cepas de BCoV reportadas en la literatura en diferentes cultivos celulares (17,21,22,24,13,23).

El aislamiento de BCoV en cultivo de tejido resulta difícil, de aquí que son pocos los reportes de aislamiento de este virus. La línea HRT-18, resultó ser la más sensible para el aislamiento primario. Benfield y Saif, (2) comunicaron el hallazgo de un solo aislamiento a partir de material fecal y secreciones nasales de

TABLA 1. Provincias del país donde se aisló BCoV a partir de muestras de heces fecales de bovinos que padecieron de disentería de invierno./ *Provinces of the country where BCoV was isolated from bovine faecal samples with winter dysentery*

Aislados	Procedencia	Título infectivo Log ₁₀ DICT ₅₀	Reducción del título infectivo Log ₁₀ DICT ₅₀
VB05/04	Matanzas	7.5	5
VB59/04	Cienfuegos	8.05	5.55
VB73/04	La Habana	6.5	5
VB102/04	Sancti Spíritus	5.05	3.51
VB117/04	Guantánamo	7.05	5.55
VB127/04	Santiago de Cuba	4.5	4.5
VB135/04	Las Tunas	7.5	4
VB144/04	Villa Clara	6.5	5.02
VB160/04	Ciego de Ávila	7.5	5.96
VB205/04	Holguín	5.5	5.5
VB208/04	Granma	4.5	4.5
VB04/05	Camagüey	7.54	5.04

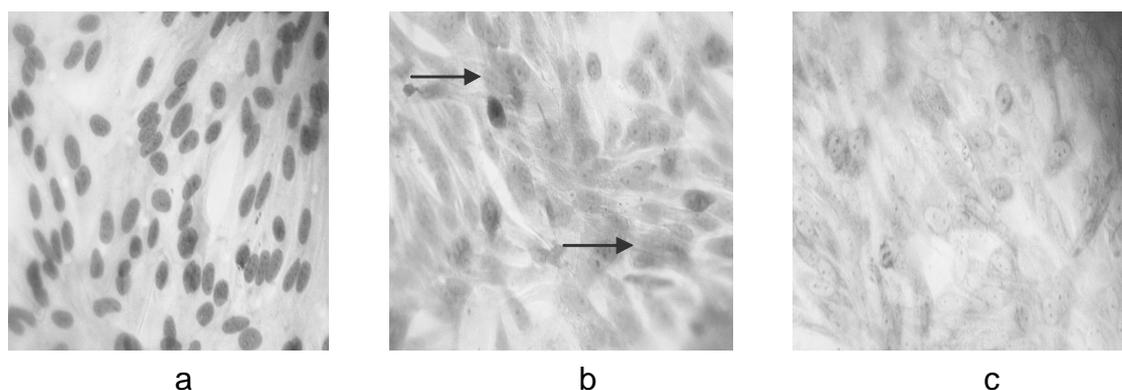


FIGURA 1. Cultivo primario de riñón de ternero. Tinción de Giemsa 40X. a) control de células no infectadas; b) alargamiento celular y formación de sincitios en células infectadas con el aislado VB73/04, 72 horas post-inoculación; c) degeneración en células infectadas con el aislado VB73/04, 120 horas post-inoculación./ *Primary culture of calf kidney. Giemsa stain 40X. a) uninfected cell; b) enlarged cells and syncytia induced by the VB73/04 isolate, three days after inoculation; c) degeneration cells induced by VB73/04 isolate, five days after inoculation.*

terneros gnotobióticos inoculados experimentalmente con material fecal obtenido de bovinos adultos con signos de disentería de invierno.

Tsunemitsu *et al.* (23) en 180 muestras colectadas de terneros obtuvieron 5 aislados (3%) de material fecal y 56 de secreciones nasales (31%). Jerez *et al.* (13) empleando HmLu-1 de 20 muestras de material fecal procedente de terneros con signos clínicos de diarrea, positivas a BCoV por hemoaglutinación, obtuvieron 8 aislados (40%).

Lo importante de esta investigación es que se logró aislar el virus a partir de las doce muestras eva-

luadas, y suponemos que se debió al empleo de mezclas de heces fecales, evaluadas previamente por aglutinación de eritrocitos de hámster, con altos títulos hemoaglutinantes, lo que resulta un elemento a considerar teniendo en cuenta la baja sensibilidad del aislamiento de BCoV en cultivo de tejido. A partir de estos resultados se recomienda seguir la metodología empleada en esta investigación, lo que permite aumentar la sensibilidad del aislamiento de BCoV con el empleo de muestras en mezclas, y garantiza una mejor eficiencia en el diagnóstico de la enfermedad a nivel poblacional.

Las muestras procedentes de las provincias Villa Clara y Camagüey se obtuvieron de bovinos que se habían recuperado de la infección, sin embargo, en ambos casos se logró el aislamiento del virus, lo que coincide con el reporte de Mebus (18) y Martínez *et al.* (16) quienes comunicaron la existencia de animales portadores, los cuales después de recuperarse de la enfermedad continúan eliminando virus por periodos prolongados, los que constituyen una fuente potencial para futuras infecciones.

Se logró aislar el virus por primera vez en Cuba lo que permitió confirmar el diagnóstico clínico epizootico de disentería de invierno. Estos resultados constituyen la base para futuras investigaciones encaminadas a la obtención y caracterización de cepas del virus para la generación de diagnosticadores y el desarrollo de candidatos vacunales y/o antivirales, lo cual resulta imprescindible para el establecimiento de un programa de control. Además se cuenta con un banco de aislados por provincias que brinda la posibilidad de realizar estudios futuros relacionados con la epidemiología molecular de BCoV.

REFERENCIAS

- Barrera, M.; Rodríguez, E.; Betancourt, A.; Frías, M.T. y Brandao, P. (2006): First report in Cuba of bovine coronavirus detection in a winter dysentery outbreak. *Sapn. J. Agric. Res.* 4(3): 221-224.
- Benfield, D.A. y Saif, L.J. (1990): Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery. *J. Clin. Microbiol.* 28(6): 1454-1457.
- Betancourt, A.; Rodríguez, E. y Barrera, M. (2005): Coronavirus bovino asociado a Disentería de Invierno en Cuba. *Rev. Salud. Anim.* 27(3): 183-185.
- Betancourt, A.; Rodríguez, E.; Joa, R.; Ancizar, J.A. y Barrera, M. (2005): Reproducción experimental de diarreas con Coronavirus bovino en terneros recién nacidos privados de calostro. *Rev. Salud. Anim.* 27(3): 171-175.
- Brandao, P.E.; Birgel, H.E.; Gregori, F.; Rosales, C.A.R.; Ruiz, V.L.A.; Jerez, J. A. 2002. Bovine coronavirus detection in adult cows in Brazil. *Arq. Inst. Biol., Sao Paulo.* 69 (2): 103-104.
- Brandao, P.E.; Gregori, F.; Heinemann, M.B.; Lima, C.H.A.; Rosales, C.A.R.; Ruiz, V.L.A.; Jerez, J.A. (2001): Animal coronaviruses. *Virus Rev. And Res.* 1(6): 7-13.
- Brandao, P.E.; Gregori, F.; Monteleone, G.S.; Soares, R.M.; Rosales, C.A.R.; Jerez, J.A. (2003): Nested PCR assay for detection of bovine coronavirus S1 gene. *Arq. Inst. Biol.* 70(1): 1-3.
- Dringeliene, A.; Markevieius, A.; Aeaite, J. (2004): Cellular immunity of coronavirus-infected bovine from different districts of Lithuania. *Ekologija.* 4: 1-5.
- González, J.M.; Gómez-Puertas, P.; Cavanagh, D.; Gorbaleya, A.E.; Enjuanes, L. A. (2003): A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. *Arch. Virol.* 148(11): 2207-2235.
- Hartel, H.; Nikunen, S.; Neuvonen, E.; Tanskanen, R.; Kivela, S.L.; Aho, R.; Soveri, T.; Saloniemä, H. (2004): Viral and bacterial pathogens in bovine respiratory disease in Finland. *Acta Vet. Scand.* 45: 193-200.
- Horner, G.W.; Hunter, R.; Kirkbride, C.A. (1975): A coronavirus-like particles present in faeces of cows with diarrhea. *New Zeland Vet. J.* 23(5): 98.
- Jeong, J.H.; Kim, G.Y.; Yoon, S.S.; Park, S.J.; Kim, Y.J.; Sung, C.M.; Shin, S.S.; Lee, B.J.; Kang, M.I.; Park, N.Y.; Koh, H.B.; Cho, K.O. (2005): Molecular analysis of S gene of spike glycoprotein of winter dysentery bovine coronavirus circulated in Korea during 2002-2003. *Virus Res.* 108: 207-212.
- Jerez, J.A.; Gregori, F.; Brandão, P.E.; Rosales, C.A.R.; Ito, H.I.; Buzinaro, M.; Sakai, T. (2005): Isolation of bovine coronavirus (BCoV) in monolayers of HmLu-1 cells. *Braz. J. Microbiol.* 36: 3.
- Knipe, D.M.; Howley, P.M.; Griffin, D.E.; Lamb, R.A.; Martin, M.A.; Roizman, B.; Straus, S.E. (2001): Fundamental Virology. Part II. Specific Virus Families. Coronaviridae: The Viruses and Their Replication. Fourth Edition. 641-664.
- Liu, L.; Hagglund, S.; Hakhverdyan, M.; Alenius, S.; Larsen, L.E. y Belák, S. (2006): Molecular epidemiology of bovine coronavirus on the basis of comparative analyses of the S gene. *J. Clin. Microbiol.* 44(3): 957-960.

16. Martínez, A.; Caballero, M.; Silva, S.; Jiménez, C. (2002): Aislamiento y caracterización de coronavirus bovino asociado a un brote de diarrea epizoótica (Disentería Bovina) en bovinos adultos en Costa Rica. III Seminario Internacional de Sanidad Animal y I Seminario de Producción Animal. ESPE, Sangolquí 12-15/11/2002.
17. Mebus, C.A.; Stair, E.L.; Rhodes, M.B.; Twiehaus, M.J. (1973): Neonatal calf diarrhea: Propagation, attenuation, and characterization of a coronavirus-like agent. *Am. J. Vet. Res.* 34: 145-150.
18. Mebus, C.A. (1990): Virus infections of vertebrates. Virus infections in ruminants. Neonatal calf diarrhea. Elsevier Science Publishers. Chapter 27: 297-300.
19. Saif, L.J. (2004): Animal coronaviruses: what can they teach us about the severe acute respiratory syndrome. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 23(2): 643:660.
20. Storz, J.; Lin, X.Q.; Purdy, C.W.; Chouljenko, V.N.; Kousoulas, K.G.; Enright, F.M.; Gilmore, W.C.; Loan, R.W. (2000): Coronavirus and Pasteurella infections in bovine shipping fever pneumonia and Evans' criteria for causation. *J. Clin. Microbiol.* 38(9): 3291-3298.
21. Takahashi, E.; Inaba, Y.; Sato, K.; Ito, Y.; Kurogi, H.; Akashi, H.; Satoda, K.; Omori, T. (1980): Epizootic diarrhea of adult cattle associated with a coronavirus-like agent. *Vet. Microbiol.* 5: 151-154.
22. Takamura, K.; Matsumoto, Y.; Shimizu, Y. (2002): Field study of bovine coronavirus vaccine enriched with hemagglutinating antigen for winter dysentery in dairy cows. *Can. J. Vet. Res.* 66: 278-281.
23. Tsunemitsu, H.; Yonemichi, H.; Hirai, T.; Kudo, T.; Onoe, S.; Mori, K.; Shimizu, M. (1991): Isolation of bovine coronavirus from feces and nasal swabs of calves with diarrhea. *J. Vet. Med. Sci.* 53: 433-437.
24. Tsunemitsu, H.; El-Kanawati, Z.R.; Smith, D.R.; Reed, H.H.; Saif, L.J. (1995): Isolation of Coronaviruses Antigenically Indistinguishable from Bovine Coronavirus from Wild Ruminants with Diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 33(12): 3264-3269.
25. Yoo, D. y Pei, Y. (2001): Full-length genomic sequence of bovine coronavirus (31 kb). Completion of the open reading frame 1a/1b sequences. *Adv. Exp. Med. Biol.* 494: 73-66.

(Recibido 5-10-2006; Aceptado 6-1-2007)



Objetivos Generales:

Investigación en la salud animal, vegetal y humana.

Prestación de servicios altamente especializados principalmente en enfermedades exóticas y cuarentenarias en animales y plantas

Tecnologías de manejo integrado de plagas en los principales cultivos agrícolas.

Producción de medios diagnósticos y medicamentos para uso veterinario, agrícola y humano.

Formación especializada.



Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria

