

ENTEROPATOGENICIDAD DE UNA CEPA DE CORONAVIRUS BOVINO

A. Betancourt*, Edisleidy Rodríguez**, R. Joa*, J.A. Ancizar*, A. López*, Damaris 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: alexl@isch.edu.cu

RESUMEN: Se logró la reproducción experimental de diarreas en terneros recién nacidos privados de calostro, luego de la inoculación por vía oral con la cepa de Coronavirus bovino Guayabal. La aparición de las diarreas se produjo a las 24 horas post-inoculación. En todos los terneros inoculados se observaron lesiones anatómicas e histopatológicas compatibles con el cuadro descrito para esta enfermedad. A partir de la instauración de la diarrea hubo eliminación de coronavirus bovino sin hallarse asociación de otro microorganismo patógeno; lo que demostró la enteropatogenicidad de la cepa Guayabal.

(Palabras clave: coronavirus bovino; cepa; enteropatogenicidad)

ENTEROPATHOGENICITY OF A BOVINE CORONAVIRUS STRAIN

ABSTRACT: The experimental reproduction of diarrheas was achieved in newborn calves deprived from colostrum, after inoculation by oral route of a Bovine coronavirus strain, Guayabal. Diarrheas appeared at 24 hours post-inoculation. In all inoculated calves, anatomical and histopathological lesions which corresponded to the disease were observed in necropsy. Bovine coronavirus was excreted after the establishment of diarrhea and not any other pathogenic microorganism involved was found. This sustained the enteropathogenicity of the Guayabal strain.

(Key words: bovine coronavirus; strain; enteropathogenicity)

INTRODUCCIÓN

La disentería de invierno es una enfermedad infecciosa, altamente contagiosa, la cual ocurre en el ganado bovino, generalmente en los meses más fríos del año (1,2). Aunque esta enfermedad fue reportada por primera vez en los Estados Unidos a principios del siglo XX, la etiología precisa estuvo sujeta a innumerables cambios durante todo este tiempo, hasta que en los últimos años se reconoce a Coronavirus bovino (BCoV) como el agente etiológico (3).

En Cuba, esta enfermedad se diagnosticó en el año 2004 (4,5) y a partir de aquí se ha realizado un grupo de investigaciones, encaminadas al desarrollo de métodos de diagnóstico, obtención y caracterización de aislados autóctonos.

Para el desarrollo de un programa de control de esta enfermedad en Cuba resulta imprescindible con-

tar con una cepa enteropatógena, con características físicas, químicas y biológicas definidas para su empleo en futuros ensayos de confrontación.

El propósito de esta investigación obedece a la necesidad de determinar si la cepa Guayabal, obtenida a partir de un brote de disentería de invierno en Cuba y caracterizada posteriormente resulta enteropatógena para terneros recién nacidos privados de calostro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon cuatro terneros mestizos (5/8 Holstein 3/8 Cebú), privados de calostro, de un día de edad, obtenidos de partos bajo vigilancia, los que se trasladaron inmediatamente al área de la inoculación en bolsas plásticas estériles. De ellos tres se inocularon con la cepa Guayabal (T-7, T-8 y T-9) y se dejó un

ternero (T-10) inoculado como control. Los animales fueron colocados en pequeños cuartos ubicados en un local limpio desinfectado previamente, con una temperatura promedio de 25 °C. La alimentación de estos animales se basó en leche estéril, que se le suministró a razón de 4 L diarios por animal, distribuidos en dos tomas, una cada 12 h. Durante cada experimento a cada ternero se le suministró 3g de Ampicillín y 4g de Estreptomicina por vía oral cada 12 h con el fin de mantenerlos libres de otros gérmes.

El inóculo utilizado fue sobrenadante de cultivo de tejido, obtenido después de que el efecto citopatogénico estuvo entre 80-90% a partir de la inoculación de la cepa Guayabal tercer pase en MDBK (riñón bovino), con un título infectivo de $10^{9.5}$ DICT₅₀/mL. Para la obtención de un inóculo control se empleó sobrenadante de MDBK.

Para la inoculación se utilizaron 40 mL en todos los casos y el inóculo fue suministrado por vía oral a través de una sonda esofágica.

Los animales fueron controlados clínicamente durante 5 días, con una frecuencia de 6 horas. Se observaron los siguientes aspectos: estado general, apetito, temperatura corporal, pulso, frecuencia respiratoria, coloración de las mucosas y características de las heces fecales, observando la consistencia, cantidad, color y olor, además de la presencia de virus. En el caso de la consistencia se estableció una escala de 0-4, 0 representa heces moldeadas, 1 pastosas, 2 semilíquidas, 3 líquidas y 4 diarreas profusas.

Para el control de la eliminación de BCoV se extrajeron muestras de heces fecales y exudado rectal; en el momento de la inoculación y a partir de aquí con una frecuencia de 6 horas hasta el final del experimento. Aislamiento viral e identificación: Para el aislamiento viral se utilizaron monocapas de CPRT (cultivo primario riñón de ternero) creciendo en placas de poliestireno de 24 pozos. La identificación de los aislamientos se realizó por seroneutralización (6) frente a un antisuero policlonal anti BCoV, preparado por inoculación de conejos con virus purificado por gradiente de sacarosa (manuscrito en preparación).

Se realizó el sacrificio de los terneros por insensibilización con cloroformo y desangrados por punción de la vena yugular. En todos los casos se realizó la descripción macroscópica externa y de órganos internos.

Para el estudio histopatológico se analizaron fragmentos de duodeno, yeyuno, ileon, ciego, colon y recto, con ganglios linfáticos mesentéricos, selecciona-

dos al hacer la necropsia. Se conservó cada fragmento en formol al 10% en proporción 1:10 y procesados posteriormente por la técnica de inclusión en parafina y coloreadas con hematoxilina y eosina; además de que se tomaron muestras de duodeno, yeyuno, ileon y colon para el aislamiento viral.

Se realizaron siembras bacteriológicas en medio agar sangre y verde brillante, a partir de las muestras obtenidas por hisopaje rectal, además se realizó control parasitológico a partir de muestras de heces fecales en cada emisión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tres terneros inoculados con la cepa Guayabal presentaron diarreas con diferentes grados de variación en cuanto a la severidad y duración de las mismas (Tabla 1). Las diarreas comenzaron a partir de las 24 horas PI.

Las heces fecales con cambios en la consistencia se caracterizaron por un color que varió desde el amarillo intenso hasta amarillo blancuzco (Figura 1), con abundante mucus cuando no era líquida, que le daba aspecto de gelatina. En ocasiones las heces tenían restos de sangre. Todos los animales, salvo (T-10) (ternero control) presentaron alteraciones en la consistencia de las heces, que variaron desde pastosas hasta líquidas. Resultó más prolongada la presencia de heces líquidas en el T-8 (casi 24 horas).

Todos los terneros desarrollaron diarreas hasta el quinto día PI (post-inoculación) (tabla 1), pero resultaron más severas entre las 48-72 horas PI. La severidad de las diarreas varió desde pastosas hasta profusas, solo observada esta última en el ternero (T-8), las que resultaron persistentes por más de 24 horas. En los terneros (T-7 y T-9) las diarreas fueron más severas, líquidas a partir de las 48 horas PI y hasta alrededor de las 72 horas PI.

Existió correlación entre la presencia de virus en las heces fecales y el cambio de consistencia de las mismas, ya que cuando estas fueron firmes no se detectó virus. Se produjo eliminación de BCoV tanto en las heces líquidas como pastosas. En las muestras de heces de todos los terneros empleados en este experimento no hubo crecimiento bacteriano. No se observaron protozoarios ni otros parásitos.

Desde el punto de vista clínico se observaron en todos los terneros síntomas de abatimiento e indiferencia al medio circundante, sin embargo, no se evidenció pérdida del apetito en ningún caso. La temperatura corporal durante todo el experimento se mantuvo dentro del rango fisiológico. No se observaron

TABLA 1. Resultados de la eliminación de BCoV en relación con el tiempo post-inoculación y la presentación de diarreas en terneros inoculados./ *Results of the elimination of BCoV in relation with the post-inoculation time and the presence of diarrheas.*

Tiempo PI (h)	Terneros inoculados con la cepa Guayabal						Ternero control	
	T-7		T-8		T-9		T-10	
	BCoV	Diarrea*	BCoV	Diarrea*	BCoV	Diarrea*	BCoV	Diarrea*
0	-	0	-	0	-	0	-	0
6	-	0	-	0	-	0	-	0
12	-	0	-	0	-	0	-	0
18	-	0	-	0	-	0	-	0
24	+	2	+	3	+	2	-	0
36	+	2	+	4	+	2	-	0
48	+	3	+	4	+	3	-	0
72	+	3	+	3	+	3	-	0
96	+	2	+	2	+	2	-	0
120	+	1	+	1	+	1	-	0

+aislamiento viral en cultivos primarios de riñón de ternero, *consistencia de las heces fecales: 0 moldeadas; 1 pastosas; 2 semilíquidas; 3 líquidas y 4 diarreas profusas. PI: post-inoculación.



a



b

FIGURA 1. Terneros recién nacidos, privados de calostro e inoculados experimentalmente con la cepa Guayabal. a) Diarreas pastosas de color amarillo, 24 horas PI; b) Diarreas pastosas de color amarillo y mal estado general, 3 días PI./ *Newborn calves deprived from calostrum experimentally inoculated with the Guayabal strain. a) mash yellow diarrheas, 24 hours post-inoculation; b) mash yellow diarrheas and not well general state, 3 days post-inoculation.*

signos de deshidratación y todos los animales se recuperaron espontáneamente.

Resultados similares a los obtenidos en este experimento fueron publicados por Mebus *et al.* (7) quienes caracterizaron el cuadro clínico de BCoV por la presentación de diarreas líquidas, amarillas, con un periodo de incubación alrededor de las 18-24 horas PI, en algunos casos las heces contenían mucus y restos de sangre. Las diarreas persistían durante 5-6 días, provocaban una severa deshidratación después

de 48-62 horas de haber comenzado. En otro reporte Mebus *et al.* (8) comunicaron que a partir de las 15 horas PI los terneros presentaban una severa depresión y anorexia, mientras que las diarreas comenzaron a partir de las 18-19 horas PI, al inicio se tornaban pastosa y más tarde líquidas.

Travén *et al.* (3) reprodujeron las diarreas en terneros, las que comenzaron entre las 24-48 horas PI, que resultaron moderadas entre las 48-72 horas PI, y a partir de este tiempo se tornaron líquidas y profu-

sas durante tres días seguidos, hasta que se recuperaron. Uno de los terneros presentó restos de sangre en las heces fecales el primer día de las diarreas profusas, mientras que en otros dos terneros se observó la presencia de mucus en las heces fecales. En cuanto al estado general no reportaron pérdida del apetito, en un solo caso se observó apatía y mal estado general, alrededor de las 48 horas PI.

Cho *et al.* (9) al reproducir experimentalmente el cuadro entérico de BCoV en terneros gnotobióticos y privados de calostro, reportaron la presentación de diarreas, que variaron desde pastosas hasta profusas, con eliminación viral a partir de las 24-48 horas PI y una persistencia de la excreción de virus por más de 15 días PI.

En todos los terneros inoculados con BCoV se encontraron alteraciones anatomopatológicas a lo largo del tracto digestivo al realizar la necropsia a las 120 horas PI (Figura 2), caracterizadas por la dilatación de los intestinos con paredes finas y traslúcidas y la presencia de contenido líquido, de color amarillo y presencia de hiperemia a nivel de la mucosa y de la serosa (Figura 2). En el ternero control (T-10) no se observaron alteraciones anatomopatológicas.

Entre las principales lesiones encontradas al reproducir el cuadro anatomopatológico de BCoV en terneros, Mebus (10) describió la presencia de estómago distendido, con leche coagulada en su interior, a lo largo del intestino delgado dilatación, flacidez y aumento del contenido líquido, de color amarillo, observándose con frecuencia trastornos circulatorios,

tales como congestión y hemorragias petequiales en ciego y colon espiral, además de aumento de tamaño de los ganglios linfáticos mesentéricos.

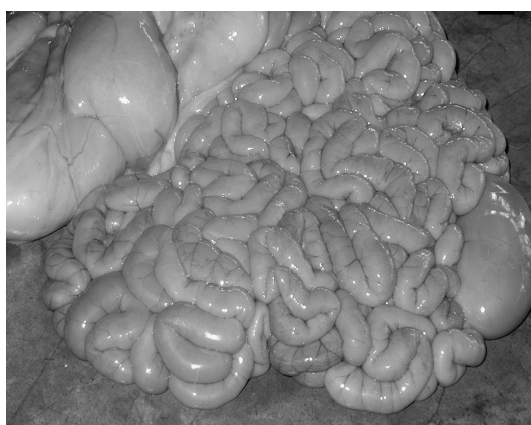
Las alteraciones histopatológicas observadas a lo largo del intestino delgado se caracterizaron por la presencia de necrosis de las células epiteliales, atrofia de las vellosidades (Figura 3), áreas de descamación e infiltrados linfocitarios en la lámina propia. En las criptas del colon se observó degeneración, necrosis celular (Figura 3) e incremento del número de linfocitos y células plasmáticas a nivel de la lámina propia. En los ganglios linfáticos mesentéricos se observó una marcada despoblación linfocitaria. El ternero control (T-10) no presentó alteraciones histopatológicas (Figura 4).

En general las variaciones celulares de los distintos segmentos del intestino delgado y grueso, son compatibles con las descritas para esta enfermedad.

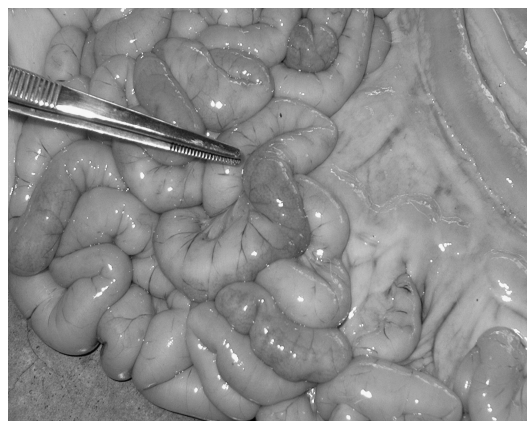
Mebus (10) al estudiar los cambios histopatológicos en terneros inoculados experimentalmente con BCoV describió la presencia de daños severos, caracterizados por necrosis, degeneración y atrofia a lo largo de todo el intestino y cambios circulatorios, básicamente del tipo de hiperemia y hemorragias.

Por su parte Mebus *et al.* (7) reportaron la depleción linfocítica y cariorrexis en la zona cortical de los nódulos linfáticos debido al tiempo de duración de la infección.

MacGavin *et al.* (1) describieron además de las alteraciones ya mencionadas, el cambio del epitelio del intestino delgado y del colon por células cuboidales

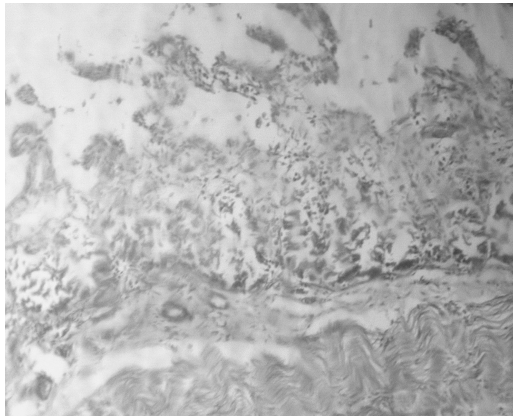


a

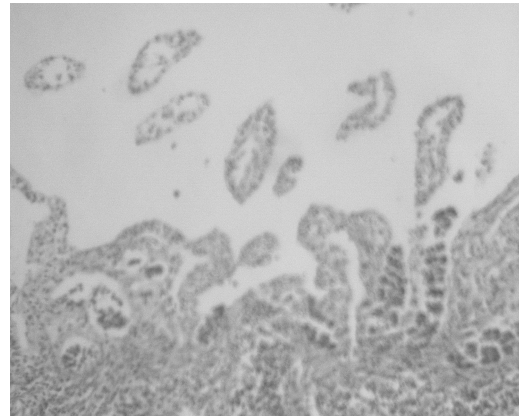


b

FIGURA 2. Lesiones anatomopatológicas en terneros recién nacidos, privados de calostro e inoculados con la cepa Guayabal. a) Asas intestinales distendidas y traslúcidas; b) Hiperemia en asas intestinales. / *Anatomopathologic disorders in newborn calves deprived from calostrum experimentally inoculated with the Guayabal strain. a) Translucent and loosened intestinal walls; b) Congestion in intestinal walls.*

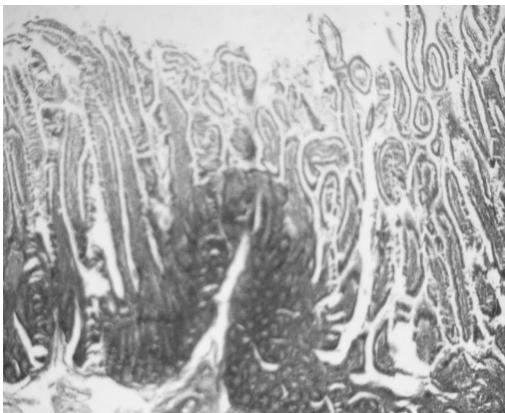


a

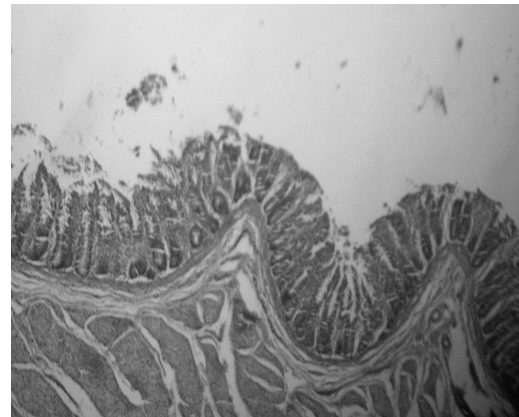


b

FIGURA 3. Lesiones histopatológicas en terneros recién nacidos, privados de calostro e inoculados experimentalmente con la cepa Guayabal. a) Atrofia de las vellosidades y hemorragias en la mucosa del duodeno; b) Necrosis y degeneración de las células epiteliales en colon. H.E. 10X./ *Histopathologic disorders in small intestine of the newborn calves deprived from calostrum experimentally inoculated with the Guayabal strain. a) Villous atrophy and hemorrhagic areas of the duodenum mucosa; b) Necrosis and degeneration of the epithelial cells in colon. H.E. 10X*



a



b

FIGURA 4. Imágenes histológicas de órganos del ternero control sin alteraciones en la inoculación experimental con BCoV. a) Duodeno; b) Colon. H.E. 10X./ *Histologic images of intestine of the control calf. a) duodenum; b) colon. H.E. 10X.*

inmaduras, lo que no pudo ser apreciado en esta investigación debido al fugaz periodo de la enfermedad.

Las características del cuadro clínico en cuanto a duración del periodo de incubación, consistencia de las heces fecales y aparición de signos clínicos y lesiones anatómicas e histopatológicas, coinciden con las descritas para este tipo de reproducción experimental, comportándose de forma similar a otras cepas de BCoV reportadas en la literatura (1,5,7,8,9,10,11).

Los resultados obtenidos confirmaron que esta cepa produce un cuadro diarreico en terneros recién

nacidos privados de calostro. La cepa Guayabal resulta ser, por tanto, una cepa virulenta, dado que los terneros presentaron severos signos clínicos y lesiones de la enfermedad. Estos resultados son de interés, ya que da la posibilidad de desarrollar un modelo de infección experimental con virus crecidos en cultivos celulares, lo que simplifica la obtención y titulación del virus.

Varios autores han logrado reproducir experimentalmente las diarreas, ya sea administrando a terneros recién nacidos un filtrado estéril de heces

diarreicas contentivo de BCoV o con virus producidos en cultivos celulares (3,7,8). En este sentido la posibilidad de desarrollar un modelo de infección experimental en terneros neonatos resulta importante, en primer lugar debido a que la presencia de BCoV en Cuba ha sido confirmada en una alta proporción de heces de bovinos y se ha observado que su asociación con la diarrea es altamente significativa (1,2), por lo que para confirmar la patogenicidad de una cepa aislada de campo se hace necesario reproducir experimentalmente la enfermedad en condiciones controladas y utilizando animales privados de calostro. En segundo lugar, y no menos importante se hace necesario contar con este modelo de infección experimental en Cuba, lo que abre las puertas a futuras investigaciones encaminadas a la implementación de programas de control sobre la base del desarrollo de medios de diagnóstico y la generación de candidatos vacunales y/o antivirales, para los cuales se hace necesario contar con una cepa enteropatógena de referencia para futuros ensayos de confrontación.

REFERENCIAS

1. McGavin MD, Carlton WW, Zachary JF. Thomson's Special Veterinary Pathology. Alimentary System. Third Edition. 2001; 1-77p.
2. Saif, L. J. Animal coronaviruses: what can they teach us about the severe acute respiratory syndrome. *Rev sci tech Off Int Epiz.* 2004;23(2):643-660.
3. Travén M, Naslund K, Linde B, Silván A, Fossum C, Hedlund KO, et al. Experimental reproduction of winter dysentery in lactating cows using BCoV infection in milk-fed calves. *Veterinary Microbiol.* 2001;81(2):127-151.
4. Barrera M, Rodríguez E, Betancourt A, Frías MT, Brandao P. First report in Cuba of bovine coronavirus detection in a winter dysentery outbreak. *Sapn. J Agric Res.* 2006;4(3):221-224.
5. Betancourt A, Rodríguez E, Joa R, Ancizar JA, Barrera M. Reproducción experimental de diarreas con Coronavirus bovino en terneros recién nacidos privados de calostro. *Rev Salud Anim.* 2005;27(3):171-175.
6. Betancourt A, Rodríguez E, Relova D, Barrera M. Aislamiento de Coronavirus bovino por primera vez en Cuba. *Rev Salud Anim.* 2007;29(2):128-132.
7. Mebus CA, Stair EL, Rhodes MB, Twiehaus MJ. Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a coronavirus-like agent. *Vet Pathol.* 1973;10:45-64.
8. Mebus CA, Newman LE, Stair EL. Scanning electron, light and immunofluorescent microscopy of intestine of notobiotic calf infection with calf diarrhea coronavirus. *Am J Vet Res.* 1975;36:1719-1725.
9. Cho KO, Hoet SC, Loerch T, Wittum E, Saif LJ. Evaluation of Concurrent Shedding of Bovine Coronavirus Via the Respiratory and Enteric Route in Feedlot Cattle. *Am J Vet Res.* 2004;62:1436-41.
10. Mebus CA. Virus infections of vertebrates. Virus infections of ruminants. Neonatal calf diarrhea. Elsevier Science Publishers. 1990; Chapter 27:297-300 p.
11. Kim GY, Yoon SS, Park SJ, Kim YJ, Sung CM, et al. Detection and isolation of winter dysentery bovine coronavirus circulated in Korea during 2002-2004. *J Vet Med Sci.* 2005;67:187-189.

(Recibido 2-4-2008; Aceptado 20-7-2008)