


Seguimiento molecular de la presencia del coronavirus respiratorio bovino en corral de engorda en el noroeste de México



Soila Maribel Gaxiola Camacho ^a

Gilberto López Valencia ^b

Enrique Trasviña Muñoz ^b

Nohemí Castro Del Campo ^a

José Carloman Herrera Ramírez ^b

Francisco Javier Monge Navarro ^{a*}

^a Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Blvd. San Ángel 3886, Mercado de Abastos, San Benito. 80260 Culiacán Rosales, Sinaloa, México.

^b Universidad Autónoma de Baja California. Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. Mexicali, Baja California, México, México.

* Autor de correspondencia: fmongenavarro@uas.edu.mx

Resumen:

En México, son escasos los estudios sobre el coronavirus respiratorio bovino (BCoV) en ganado de engorda. Hasta la fecha, el BCoV solo se ha reportado en operaciones de engorda en el noroeste del país. Se realizó un estudio epidemiológico-molecular en ganado de engorda estabulado para establecer la prevalencia de BCoV y actualizar la información disponible sobre su presencia en la región noroeste de México. Empleando una técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) dirigida a un fragmento del gen que codifica para la proteína espiga de BCoV, se analizaron 154 muestras de ARN de exudado nasal colectadas de animales asintomáticos (n=100) y enfermos (n=54). Del total de las muestras, 95 resultaron positivas, para una prevalencia general de 61.7 % y un promedio de 1×10^5 partículas virales/ml de exudado nasal. De las muestras positivas, 33 (21.4 %)

pertenecían al grupo de animales enfermos, y 62 (40.3 %) al grupo de animales asintomáticos. La prevalencia del BCoV establecida en este trabajo representa un aumento de 23.7 puntos porcentuales con respecto al 38.0 % de prevalencia reportado previamente en los mismos corrales de engorda. Lo anterior, hace evidente la necesidad de implementar programas de vacunación que confieran protección contra el BCoV y ayuden a controlar su expansión en el ganado de engorda en la región. Se requiere de más estudios eco-epidemiológicos para identificar las posibles causas que favorecen la rápida propagación de este virus entre el ganado de engorda del noroeste de México.

Palabras clave: Coronavirus respiratorio bovino, Ganado de engorda estabulado, qRT-PCR, Prevalencia, Carga viral.

Recibido: 07/05/2024

Aceptado: 06/05/2025

Introducción

El coronavirus bovino (BCoV) es un virus envuelto con un genoma de ARN monocatenario y polaridad positiva de aproximadamente 31 kilobases (kb) perteneciente al género Betacoronavirus de la familia Coronaviridae⁽¹⁾. El BCoV puede generar enfermedades respiratorias y gastrointestinales en el ganado, excretando el virus a través de las secreciones nasales y heces. Es un virus patógeno asociado con la diarrea neonatal del ternero y con la disentería de invierno en el ganado adulto. Se reconoce como uno de los virus que contribuyen al desarrollo del complejo respiratorio bovino (CRB) en ganado de todas las edades⁽²⁾. El BCoV se transmite fácilmente por contacto directo dentro del hato y entre hatos en una región, o de manera indirecta a través del personal o utensilios contaminados⁽³⁾. La presencia de enfermedades asociadas con el CRB tiene un fuerte impacto en la industria ganadera debido principalmente a los costos generados sea por: la enfermedad o la muerte del ganado, la disminución en la ganancia de peso y por consiguiente en el valor de la canal, los costos de los medicamentos y servicios veterinarios. Las medidas preventivas contra el CRB se basan en programas de vacunación y la administración de antibióticos metafilácticos para reducir el riesgo de coinfecciones de origen bacteriano⁽⁴⁾.

La presencia de BCoV se reporta frecuentemente en poblaciones de ganado de engorda y lechero a nivel mundial; las tasas de prevalencia varían del 2 al 90 % según el país o la región⁽¹⁾. En México, se han reportado infecciones causadas por CRB en la mayoría de las regiones productoras de ganado de engorda⁽⁵⁾. Sin embargo, los estudios sobre la presencia de BCoV en la industria ganadera mexicana son todavía muy escasos. De hecho, la presencia

de BCoV solo se ha reportado en explotaciones ganaderas en el noroeste del país, donde el 38 % de los animales positivos al virus fueron identificados por técnicas moleculares⁽⁶⁾. Las infecciones causadas por BCoV afectan de manera negativa a la economía del sector agropecuario debido a la disminución en la productividad y en el comercio, así como por la disminución en la seguridad alimentaria⁽⁷⁾. Además, los coronavirus poseen una plasticidad que les permite infectar y causar enfermedades en una amplia variedad de especies animales, y tienen una alta capacidad de replicación y mutación. Esto los convierte en una amenaza para la salud animal e incluso para la salud pública debido a su potencial de mutación y adaptación a múltiples especies animales, incluyendo a los humanos⁽⁸⁾. Cada año, se introducen alrededor de 400,000 cabezas de ganado a la región noroeste de México desde ranchos de crianza ubicados en 23 estados productores de ganado. La mayoría (95 %) de este ganado tiene como destino los corrales de engorda en el municipio de Mexicali, donde es engordado, finalizado, sacrificado y comercializado en México y en el extranjero⁽⁵⁾.

Existen reportes previos de la presencia de BCoV y otros patógenos asociados con el CRB en esta región. Sin embargo, no hay reportes actualizados sobre la situación de BCoV en el noroeste de México. El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio epidemiológico-molecular de BCoV en ganado de engorda estabulado en el noroeste de México, para establecer la prevalencia de este virus patógeno y actualizar la información disponible sobre su presencia en los corrales de engorda en la región.

Material y métodos

Aprobación ética y consentimiento informado

Todos los procedimientos de manejo y muestreo de animales se llevaron a cabo siguiendo los lineamientos de las normas y procedimientos oficiales federales aprobados para el cuidado de animales, incluyendo la NOM-051-ZOO-1995 (Cuidado humanitario de los animales durante la movilización), la NOM-024-ZOO-1995 (Especificaciones y características zoonosológicas durante el transporte de animales), y la NOM-033-ZOO-1995 (Atención humanitaria y protección animal durante el proceso de sacrificio).

Área de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en una explotación de ganado de engorda ubicada en el Valle de Mexicali, Baja California en el noroeste de México con capacidad de confinamiento para 15,000 cabezas de ganado. El procesamiento de las muestras de exudado nasal y las pruebas de qRT-PCR se realizaron en la Unidad de Laboratorios de Diagnóstico (ULADI) del Instituto de Investigación en Ciencias Veterinarias (IICV) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC).

Muestras de exudados nasales

Los muestreos se realizaron durante febrero y marzo de 2023. Se aplicó el método de muestreo por conveniencia con base en la disponibilidad de animales para participar en el estudio. Se seleccionaron ciento cincuenta y cuatro (154) cabezas de ganado (130 hembras + 24 machos), con un peso promedio de 325 kg y 30 ± 3 días de llegada al corral de engorda. Los animales se clasificaron en dos grupos: enfermos y asintomáticos. Los animales enfermos (n= 54) presentaron signos compatibles con el CRB, incluyendo fiebre ≥ 38.5 °C, respiración rápida y superficial, secreción nasal y ocular, salivación y pérdida de apetito. Los animales del grupo de asintomáticos (n= 100) no mostraron ninguno de los signos antes mencionados. La clasificación se realizó con base en el diagnóstico del oficial veterinario del corral de engorda. De los 154 animales incluidos en el estudio, se recolectó una muestra de exudado nasal profundo utilizando un hisopo estéril de poliéster de 15 cm de largo con punta de cepillo. También se recopilaron datos sobre cada animal muestreado, incluyendo el número de identificación del Sistema Nacional de Identificación Individual del Ganado (SIINIGA), el peso en kilogramos, el sexo, el estado de origen, la presencia de signos clínicos y la temperatura rectal al momento del muestreo. Se utilizó esta información para definir los grupos de estudio.

Extracción de ARN del exudado nasal

La extracción del ARN de los exudados nasales se realizó empleando los reactivos Aurum Total RNA minikit (Bio-Rad, México), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN extraído se reconstituyó en un volumen final de 20 μ l con la solución de elución de ARN suministrada con los reactivos y se conservó congelado a -80 °C hasta el momento de la prueba molecular.

Los oligonucleótidos para el gen de la proteína espiga de BCoV

Se diseñó una plataforma de qRT-PCR a partir de la secuencia del gen que codifica la proteína espiga del BCoV (número de referencia de GenBank: OP037402.1). La secuencia tiene una longitud de 4092 nt y se encuentra entre las posiciones 23628 y 27719 del genoma del coronavirus bovino SDSU/2020/06/R (publicado el 25 de julio de 2023). De dicha secuencia, se seleccionó un fragmento de 78 pb, ubicado entre las posiciones 25672 y 25750, como secuencia objetivo para el qRT-PCR. Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando el programa GeneRunner versión 6.1 (<http://www.generunner.net/>) y la herramienta OligoCalc versión 3.2 (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) (Cuadro 1). Los oligonucleótidos fueron sintetizados, envasados y enviados liofilizados por Synbio Technologies (New Jersey, EE.UU.). Estos se reconstituyeron con agua grado biología

molecular para obtener una concentración estándar inicial de 100 micromolar (μM) y una concentración final de trabajo de 10 μM .

Cuadro 1: Características de los oligonucleótidos, el amplicón y el control de ADN sintético utilizados en la plataforma qRT-PCR-BCoV a partir del gen de la proteína espiga del coronavirus bovino GenBank: OP037402.1

Oligonucleótido:	BCoVF1		
Secuencia:	5'- CGTAGTTGCTATAGTGGTCG -3'		
Inicio: 25,672	Longitud: 20 pb	Tm: 52 °C	GC: 50 %
Oligonucleótido:	BCoVR1		
Secuencia:	3'- GATATTCGAAATAGCAATGC-5'		
Inicio: 25,729	Longitud: 21 pb	Tm: 49 °C	GC: 38 %
Producto: 78 pb	Tm amplicón: 79.5 °C		
Secuencia de control de ADN del BCoV sintético:			
ATGGTAATCTCTACGGTTTTAGAGACTACTTAACAAATAGAACTTTTATGA			
<u>TTCTAGTTGCTATAGTGGTCGTGTTTCAGCGGCCTTTCATGCTAACT</u>			
<u>CTTCCGAACCAGCATTGCTATTTCTGGAATATCAAATGCAATTACGTTTT</u>			
TAATAACACTCTTTCACGACAGCTGCAACCTATTAA			
Producto: 184 pb			

El amplicón de 78 pb se muestra en negrita, los oligonucleótidos se muestran en negrita y subrayados, y las secuencias de 53 pb que flanquean el amplicón están en letras mayúsculas y sin negrita.

Control positivo para la plataforma del qRT-PCR-BCoV

El control positivo consistió en una molécula de ADN sintético que corresponde al amplicón de 78 pb obtenido utilizando los oligonucleótidos ya descritos, más la adición de un fragmento de 53 pb en cada extremo de la secuencia de amplificación para producir una molécula de 184 pb de ADN sintético (Cuadro 1). El uso de controles positivos confirma la validez de los resultados para la plataforma BCoV en muestras de campo y es necesario para la generación de la curva de calibración para la plataforma BCoV-RT-PCR⁽⁹⁾. El control positivo utilizado para la plataforma qRT-PCR-BCoV fue sintetizado por Synbio Technologies (Nueva Jersey, EE. UU.), suministrado liofilizado a una concentración de 0.2 mg, y reconstituido en 1 ml de agua de grado de biología molecular.

La curva de calibración para la plataforma qRT-PCR-BCoV

Para la cuantificación del ADN amplificado, se construyó una curva de calibración utilizando el control positivo de ADN sintético en diluciones seriadas logarítmicas de 10^7 a 10^1 . Mediante la extrapolación del valor de Ct de una muestra no conocida con la curva de calibración, se cuantificó el número de amplicones producidos en una muestra⁽¹⁰⁾. Los

resultados se expresan como equivalentes genómicos (EG) por mililitro de exudado nasal. Tomando en cuenta que la secuencia de amplificación de 78 pb no se repite en el resto del genoma del coronavirus utilizado como referencia para este trabajo, se consideró que un EG equivale a una partícula viral amplificada y detectada mediante la plataforma qRT-PCR-BCoV.

Protocolo de la qRT-PCR-BCoV

Para las corridas de prueba de la qRT-PCR-BCoV, se utilizó la mezcla maestra qPCRBIO SyGreen 1-Step Go Lo-ROX de PCR Biosystems (Pensilvania, EE. UU.) para generar ADN complementario (ADNc) a partir de las muestras de ARN en el mismo tubo donde se realizó la reacción de PCR. Brevemente, cada reacción de 10 μ l contenía 5 μ l de mezcla maestra, 10 ng de ARN extraído de cada una de las 154 muestras, 0.5 μ l (400 nM) de cada uno de los oligonucleótidos BCoVf1 y BCoVr1, y 3.0 μ l de agua grado biología molecular. Adicionalmente, las reacciones de los controles positivos contenían 5 μ l de mezcla maestra, 10 ng de control positivo de ADN sintético, 0.5 μ l (400 nM) de cada uno de los oligonucleótidos BCoVf1 y BCoVr1, y 3 μ l de agua grado biología molecular. En cada prueba también se incluyeron dos controles negativos de mezcla maestra sin ADN ni ARN, y solo agua de grado de biología molecular. Las muestras se analizaron por duplicado, y los controles positivo y negativo por triplicado. Las pruebas se realizaron en un termociclador CFX96 (Bio-Rad, México). Se calcularon los parámetros de desnaturalización, hibridación y extensión utilizados en la plataforma qRT-PCR-BCoV con la herramienta Protocol AutoWriter del software Maestro del termociclador CFX96. Las condiciones de PCR fueron: un ciclo de 50 °C durante 10 min para la transcripción inversa del ARN; un ciclo de 3 min a 95 °C para la inactivación de la transcriptasa; 40 ciclos que iniciaron con desnaturalización a 95 °C durante 10 seg seguido por hibridación a 52.8 °C durante 10 seg; y un ciclo de extensión a 72 °C durante 8 seg. En cada corrida se incluyó el análisis de la curva de disociación (T_m) de 65 °C a 95 °C con incrementos de 0.5 °C. Se hizo para confirmar que las curvas de amplificación corresponden a la T_m para el amplicón de 78 pb establecido a 79.5 ± 1.0 °C, y compararlas con la T_m obtenida por el control positivo de ADN sintético y con cada una de las 154 muestras de ARN de los exudados.

Interpretación de los resultados

Los resultados de las pruebas qRT-PCR-BCoV se consideraron positivos cuando cumplieron con dos condiciones: 1) cuando una muestra desarrolló una curva de amplificación por encima del valor de corte calculado por el paquete CFX96 Maestro para cada análisis en un máximo de 40 ciclos (este valor de corte corresponde a 10 veces la desviación estándar del índice de fluorescencia promedio generado por todas las muestras durante los primeros 10 ciclos de cada análisis); y 2) cuando la curva de amplificación alcanzó una T_m de 79.5 ± 1.0

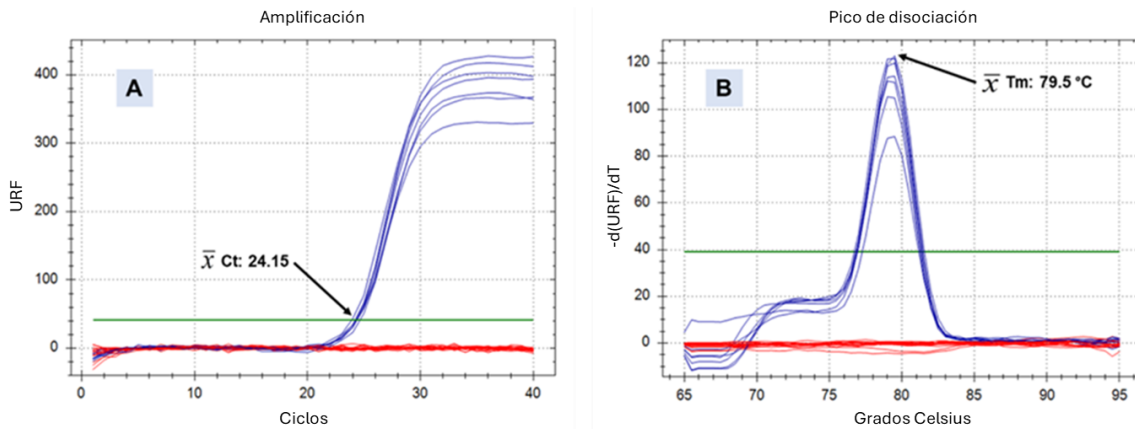
°C. Se consideraron negativos cuando no cumplieron con estas condiciones; es decir, la muestra no desarrolló una curva de amplificación por encima del valor de corte en un máximo de 40 ciclos, ni se ajustó a la T_m establecida de 79.5 ± 1.0 °C.

Resultados

Estandarización de la plataforma qRT-PCR-BCoV

Bajo las condiciones del termociclador descritas, el análisis de las curvas de amplificación y disociación realizado por el software Maestro confirmaron que la combinación óptima de reactivos para obtener la máxima amplificación del fragmento de 78 pb del gen de la proteína espiga es una mezcla de los oligonucleótidos a una concentración de 400 nM con 10 ng de ARN molde o 10 ng de control positivo de ADN sintético, 5 μ l de mezcla maestra y 3.0 μ l de agua de grado biología molecular en un volumen total de reacción de 10 μ l. En estas condiciones, el control positivo de ADN sintético desarrolló una curva de amplificación por encima de la línea de control, con un ciclo umbral (C_t) promedio de 24.15, mientras que los controles negativos no mostraron evidencia de amplificación en los 40 ciclos. El análisis de la T_m para el control positivo de ADN sintético desarrolló una temperatura promedio de 79.4 °C (Figura 1). Estos parámetros confirman la validez de la plataforma qRT-PCR-BCoV para el ensayo y el análisis de los extractos de ARN obtenidos de las 154 muestras de exudado nasal.

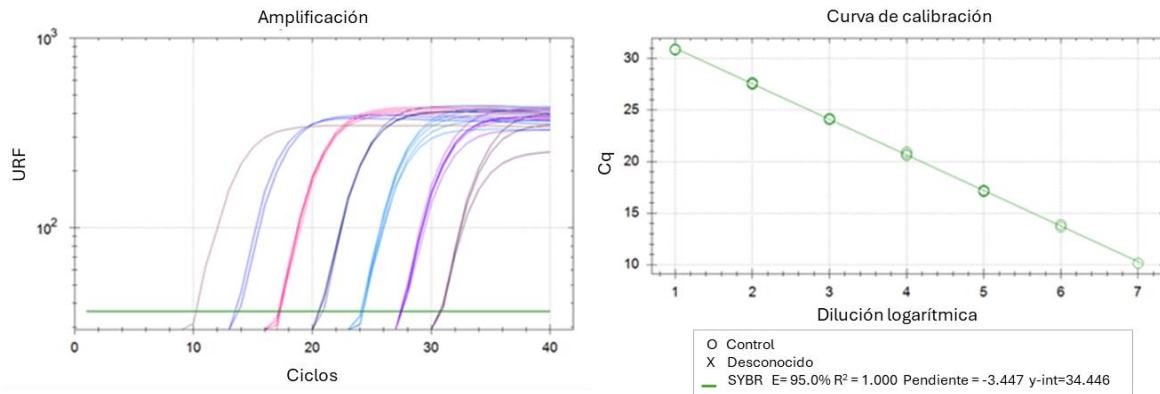
Figura 1: Las curvas de amplificación (A) y de disociación (B) de la optimización de los oligonucleótidos, el ARN molde y la mezcla maestra de la plataforma qRT-PCR-BCoV, utilizando ADN sintético de control



Curva de calibración de qRT-PCR-BCoV

Para desarrollar una plataforma molecular cuantitativa para la detección del BCoV, se construyó una curva de calibración utilizando el ADN sintético de control positivo en diluciones logarítmicas de 10^7 a 10^1 EG. El índice de fluorescencia de cada dilución logarítmica se trazó gráficamente con el software Maestro. Se produjo una curva de calibración con una eficiencia del 95 %, una amplitud de 3.447 ciclos entre las diluciones logarítmicas sin dispersión entre diluciones (expresada con un R^2 de 1.0), y un rango de detección entre 1×10^1 y 1×10^7 EG. Con este índice se pudo calcular el número de EG amplificadas y detectadas en cada muestra con base en el Ct de cada reacción (Figura 2). Es importante mencionar que, al aplicar la curva de calibración de qRT-PCR-BCoV, una EG corresponde a una partícula viral.

Figura 2: Curva de calibración para la plataforma qRT-PCR-BCoV utilizando un control de ADN sintético en diluciones logarítmicas seriadas de 1×10^1 a 1×10^7 EG



qRT-PCR-BCoV en muestras de exudados nasales

Con la plataforma qRT-PCR-BCoV, se analizaron por duplicado 154 muestras de ARN extraídas de exudado nasal del ganado de engorda. De ellas, 95 (61.7 % prevalencia general) produjeron una curva de amplificación por encima de la línea de umbral establecida por el software y se consideraron positivas para BCoV. De las muestras positivas, 33 (21.4 %) pertenecían al grupo de animales enfermos, los cuales presentaban signos asociados a CRB. Las 62 muestras positivas restantes (40.3 %) pertenecían al grupo de animales sin signos de CRB en el momento del muestreo (Cuadro 2). La T_m promedio de los controles positivos en las corridas de prueba fue de $79.4 \text{ }^\circ\text{C}$, lo cual se considera válida para un resultado positivo en la qRT-PCR-BCoV. El Ct promedio de los controles positivos durante las pruebas fue de 24.15 ciclos, equivalente a 1×10^4 EG en 10 ng de ARN molde por reacción de RT-PCR. La T_m promedio de las muestras de prueba positivas de ambos grupos fue de $79.38 \text{ }^\circ\text{C}$, el Ct promedio fue de 34.60 ciclos (equivalente a 1×10^5 partículas virales/ml de exudado nasal),

con un rango de Ct entre 30.87 y 35.95 ciclos (equivalente a 5.8×10^6 y 6.5×10^4 partículas virales/ml de exudado nasal, respectivamente).

Cuadro 2: Pruebas de qRT-PCR-BCoV de muestras de exudados nasales

Grupo	Positiva	Negativa	Total
Enfermos	33 (21.4 %)	22 (14.3 %)	54 (35.7 %)
Asintomáticos	62 (40.3 %)	37 (24.0 %)	100 (64.3 %)
Total	95 (61.7 %)	59 (38.3 %)	154 (100 %)

Los animales enfermos presentaron fiebre ≥ 38.5 °C, respiración rápida y superficial, secreción nasal y ocular, salivación y pérdida de apetito, según el diagnóstico del médico veterinario oficial del corral de engorde.

qRT-PCR-BCoV por grupo de animales y lugar de origen

El ganado incluido en el presente estudio provenía de siete estados de México: Baja California, Durango, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Sonora y Zacatecas. Los estados de Jalisco, Sonora y Zacatecas aportaron la mayor parte (83.3 %, 136/154) de los animales. De estos tres estados, Sonora tuvo la mayor proporción relativa de casos positivos (64.5 %, 20/31), seguido de Jalisco (63.2 %, 36/57) y Zacatecas (58.3 %, 28/48) (Cuadro 3).

Cuadro 3: Pruebas qRT-PCR-BCoV por lugar de origen y grupo de estudio

Origen	Positiva		Negativa		Total
	Enfermos	Asintomáticos	Enfermos	Asintomáticos	
Baja California	1	1	1	3	6
Durango	2	1	0	0	3
Jalisco	8	28	4	17	57
Michoacán	1	2	0	1	4
Nayarit	1	2	0	2	5
Sonora	6	14	7	4	31
Zacatecas	14	14	10	10	48
Total	33	62	22	37	154

Los animales enfermos presentaron fiebre ≥ 38.5 °C, respiración rápida y superficial, secreción nasal y ocular, salivación y pérdida de apetito, según el diagnóstico del médico veterinario oficial del corral de engorde.

Cabe destacar el elevado número de animales asintomáticos con resultado positivo a la prueba qRT-PCR-BCoV (65.3 %, 62/95), ya que estos animales no presentaron signos de enfermedad respiratoria durante el muestreo. Asimismo, un grupo de animales clasificados

como enfermos fue diagnosticado con enfermedad respiratoria por el veterinario del corral de engorda, y 37.3 % (22/59) de ellos resultaron negativos para el BCoV.

Discusión

Las infecciones por BCoV están ampliamente distribuidas en todo el mundo en diferentes poblaciones ganaderas, y generan pérdidas económicas significativas a la industria ganadera dedicada a la producción de carne y leche. El papel que juega el BCoV como parte del CRB ha sido objeto de intenso debate desde la década de los 1990⁽¹¹⁾, aunque se reconoce ampliamente su papel en el desarrollo de infecciones del tracto respiratorio y en la disminución de la tasa de ganancia de peso en los corrales de engorda⁽¹²⁾. Las tasas de prevalencia han aumentado en todos los lugares donde se ha reportado la presencia de BCoV. Eso se debe principalmente a tres factores: 1) la gran cantidad de virus infecciosos que se excretan a través de las secreciones nasales y las heces; 2) la presencia de portadores asintomáticos que excretan constantemente el virus por vía respiratoria o digestiva y funcionan como una fuente de infección tanto para el ganado susceptible como para otras especies animales⁽¹³⁾; y 3) el hecho de que la respuesta inmunitaria no siempre es capaz de contener eficazmente la infección por BCoV ni de eliminar completamente el virus de los animales enfermos recuperados⁽¹⁴⁾.

En el presente estudio, se desarrolló y aplicó una plataforma de PCR en tiempo real cuantitativa para la detección de un fragmento del gen que codifica la proteína espiga del BCoV en muestras de ARN extraídas del exudado nasal de ganado de engorda. La plataforma qRT-PCR-BCoV resultó en una herramienta de diagnóstico molecular cuantitativa de alta sensibilidad con altos niveles de repetibilidad y reproducibilidad, capaz de detectar hasta 10 partículas virales en una reacción de prueba que contiene 10 ng de ARN molde (Figura 2).

La prevalencia del BCoV de 61.7 % reportada aquí es 23.7 puntos porcentuales más alta que el 38.0 % reportado previamente por nuestro grupo en la misma explotación ganadera⁽⁶⁾. De acuerdo con la información proporcionada por el personal veterinario del corral de engorda, los protocolos generales de manejo animal, medicina preventiva, alimentación y alojamiento de los animales recién llegados se mantienen iguales a los de hace cinco años, cuando se realizó el estudio anterior. Esto sugiere un aumento en la tasa de infección del ganado en los estados de origen. Lo anterior, sumado al estrés derivado de los largos viajes de transporte, se manifiesta en una alta tasa de animales enfermos con signos asociados al CRB poco después de su llegada a los corrales de engorda de Baja California.

En comparación con otros estudios realizados en América del Norte, la prevalencia observada en este trabajo es superior a la reportada en Canadá, donde un estudio realizado con muestras de exudado nasal de ganado del corral de engorda a su llegada arrojó una prevalencia del

45.2 % para BCoV⁽¹⁵⁾. Sin embargo, es similar al 62.8 % de prevalencia de BCoV reportado en los Estados Unidos en ganado de engorda al inicio del tratamiento para CRB, basado en datos de exudados nasales⁽¹⁶⁾. Otro estudio en los EE.UU. arrojó una prevalencia de BCoV de 100 % al detectar patógenos virales en terneros durante un brote de CRB; todas las muestras analizadas por técnicas moleculares reaccionaron positivas para el BCoV⁽¹⁷⁾. La prevalencia observada en el presente trabajo también es similar a la de 56.0 % para BCoV en terneros diagnosticados con CRB reportada en un estudio en Brasil; no se identificó evidencia de infección con ninguno de los otros virus asociados al CRB⁽¹⁸⁾.

En Europa, los estudios sobre el BCoV en ganado de engorda reportan, en su mayoría, tasas de prevalencia inferiores a las obtenidas en este trabajo. La prevalencia reportada para Eslovenia es de 12.03 % para el BCoV, y es el segundo virus detectado con mayor frecuencia en ganado con diagnóstico de CRB⁽¹⁹⁾. La prevalencia de 22.9 % para el BCoV reportada en Irlanda es menor que el presente trabajo, y fue el virus detectado con más frecuencia⁽²⁰⁾. La prevalencia en Suiza es de 53.5 %, ligeramente inferior a la obtenida en este estudio, y, de nuevo, el BCoV fue el virus identificado con más frecuencia⁽²¹⁾. En un estudio en Italia realizado para evaluar el impacto del estrés respiratorio en terneros de carne transportados a largas distancias, se encontró una prevalencia general del BCoV de 70.12 %, superior a la reportada en este trabajo, siendo BCoV el patógeno más frecuentemente identificado⁽²²⁾.

Los informes de BCoV en el continente asiático indican tasas de prevalencia considerablemente inferiores a las obtenidas en este trabajo. Entre 2016 y 2018, la prevalencia de BCoV en Japón fue de 21.2 % en ganado sano y en ganado con evidencia de CRB⁽²⁾, mientras que en China se reportó una prevalencia del 15.26 % de BCoV en muestras de exudado nasal de ganado de engorda⁽¹⁾. En Australia, se reportó una prevalencia de BCoV del 72.0 % en ganado de engorda con enfermedad asociada a CRB⁽²³⁾. Esta prevalencia es mayor que la reportada en este trabajo, aunque esos resultados son inferiores al 40.1 % reportado previamente en ese mismo país en animales que excretan el virus a través de secreciones nasales⁽²⁴⁾.

Es importante destacar que, de acuerdo a los reportes de prevalencia mencionados en América, Europa, Asia y Australia, la frecuencia con la que BCoV ocupa el primer o segundo lugar como el patógeno más frecuente identificado asociado con CRB ha aumentado recientemente. El BCoV está desplazando a otros virus asociados con CRB y se está convirtiendo en el virus más frecuentemente identificado en ganado de engorde a nivel mundial.

La plataforma qRT-PCR-BCoV desarrollada en este trabajo se utilizó para medir el número de EG presentes en el ARN extraído de muestras de exudado nasal, es decir, el número de copias de ARN que codifican para el fragmento de 78 nt del gen de la proteína espiga de BCoV. Los resultados de las pruebas qRT-PCR para animales sanos y enfermos indicaron un

promedio de 1×10^5 partículas virales/ml de exudado nasal, con un rango de 5.8×10^6 a 6.5×10^4 partículas virales/ml. Las cargas virales del exudado nasal reportadas en este trabajo coinciden con las cargas virales excretadas a través del exudado nasal reportadas como suficientes para producir la transmisión de BCoV de animales infectados con o sin síntomas a animales susceptibles expuestos⁽²²⁾. De igual manera, al comparar los datos de carga viral (EG) en el exudado nasal con la presencia de signos clínicos o la exposición de animales sanos susceptibles a animales infectados, la información puede utilizarse como evidencia de replicación viral activa en los animales de un corral de engorda. Esto permite medir la magnitud de la infección en un corral, así como iniciar estrategias de bioseguridad para los animales que próximamente serán reubicados dentro de la explotación, para su transporte o venta⁽¹³⁾.

Aunque había un elevado número de animales asintomáticos con resultado positivo en la qRT-PCR-BCoV, no se asume al efecto protector de vacunación, ya que el corral en donde se llevó a cabo el presente estudio no vacuna a su ganado contra el BCoV. De cualquier forma, las vacunas comerciales disponibles contra el coronavirus bovino no inducen inmunidad esterilizante, es decir, no son capaces de eliminar la totalidad del virus del huésped ni de prevenir episodios posteriores de infección. El objetivo principal de las vacunas bovinas contra el coronavirus es de generar protección inmunológica contra enfermedades entéricas y respiratorias^(25,26). Es de esperar, entonces, que la presencia continua de coronavirus en ganado infectado o vacunado produzca un resultado positivo en las pruebas qPCR. Otra posible explicación de por qué varios animales asintomáticos dieron positivo en la qRT-PCR-BCoV es que se infectaron recientemente con animales portadores asintomáticos que excretaron el virus a través de secreciones nasales y heces durante el transporte o en las instalaciones, es decir, que se encontraban en una fase de proliferación viral sin signos aparentes de la enfermedad^(27,28).

En el grupo de animales que resultó negativo al qRT-PCR-BCoV pero que mostraron signos de enfermedad respiratoria, es posible que estuvieran infectados con uno o más de los otros virus asociados con el CRB, como son el IBR, BVDV tipos 1 y 2, PI3 o BRSV. Aunque existe evidencia de vacunación contra de estos virus como parte de los protocolos de bioseguridad del corral de engorda, las vacunas, sin embargo, no proporcionan una protección del 100 % contra la enfermedad y, a veces, el ganado se puede infectar incluso cuando está vacunado. Esto es debido a varios factores, como la falta de eficacia y eficiencia de las vacunas en el campo, una formulación inadecuada de la vacuna, aplicación de la vacuna en un momento inadecuado, los anticuerpos maternos y la condición de los animales⁽²⁶⁾. Además, los virus asociados con el CRB (IBR, BVDV, PI3 y BRSV) han sido ampliamente estudiados durante décadas y están reconocidos como componentes importantes en el desarrollo de la enfermedad respiratoria en el ganado. Pero, hasta hace poco, no se habían detectado agentes virales nuevos, emergentes o no reconocidos, debido a que no se habían incluido en los análisis de forma rutinaria. Actualmente, se tienen reportes de la presencia del virus de la

rinitis bovina A, el virus de la influenza bovina D y el Nidovirus bovino en ganado de engorda diagnosticado con enfermedad respiratoria bovina, así como en ganado asintomático^(29,30). Ninguno de estos virus emergentes ha sido reportado previamente en ganado de engorda en México, lo cual podría ser otra causa de enfermedad asociada con el CRB.

Conclusiones e implicaciones

La plataforma qRT-PCR para BCoV desarrollada en este estudio es una herramienta de diagnóstico molecular rápida, precisa y sensible en la detección de BCoV en muestras de exudado nasal de ganado de engorda. Se puede utilizar en el diagnóstico y la vigilancia epidemiológica de BCoV y otros agentes patógenos asociados con el CRB. El aumento de 23.7 puntos porcentuales en la prevalencia de BCoV durante cinco años en la misma región geográfica, hace hincapié a la necesidad de introducir vacunas de nueva generación que confieran protección contra este virus, junto con otras estrategias de bioseguridad para controlar la expansión de la infección por BCoV en las explotaciones ganaderas de engorda de la región. Es urgente realizar estudios eco-epidemiológicos para identificar las posibles causas que favorecen la rápida propagación de esta enfermedad entre la población ganadera de engorda en el noroeste de México.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés en cuanto al presente estudio.

Literatura citada :

1. Zhu Q, Su M, Li Z, Wang X, Qi S, Zhao F, *et al.* Epidemiological survey and genetic diversity of bovine coronavirus in Northeast China. *Virus Res* 2022;308:198632. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198632>.
2. Mekata H, Hamabe S, Sudaryatma PE, Kobayashi I, Kanno T, Okabayashi T. Molecular epidemiological survey and phylogenetic analysis of bovine respiratory coronavirus in Japan from 2016 to 2018. *J Med Vet Sci* 2020;82(6):726–730. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0587>.
3. Oma VS, Klem T, Trávén M, Alenius S, Gjerset B, Myrmel M, *et al.* Temporary carriage of bovine coronavirus and bovine respiratory syncytial virus by fomites and human nasal mucosa after exposure to infected calves. *BMC Vet Res* 2018;14(1):1-8. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1335-1>.
4. Hodnik JJ, Jezek JJ, Staric J. Coronaviruses in cattle. *Trop Anim Health Prod* 2020;52(6):2809-2016. doi:10.1007/s11250-020-02354-y.

5. Rodríguez CJL, Lopez VG, Monge NFJ, Medina BGE, Hori-Oshima S, Cueto GSA, *et al.* Detection and economic impact related to bovine respiratory disease, shrink, and traveling distance in feedlot cattle in Northwest Mexico. *Turk J Vet Anim Sci* 2017; 41(2):297-301. <https://doi.org/10.3906/vet-1603-9>.
6. Orozco CC, López VG, Muñoz-Del Real LM, Gaxiola CSM, Castro-del Campo N, Cueto GSA, *et al.* Molecular detection of bovine coronavirus associated with the bovine respiratory complex in beef cattle in the Mexicali Valley, Baja California, Mexico. *Rev Mex Cienc Pecu* 2020;11(4):933-945. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i4.5137>.
7. Stokstad M, Klem TB, Myrmel M, Oma VS, Toftaker I, Østerås O, *et al.* Using biosecurity measures to combat respiratory disease in cattle: the Norwegian control program for bovine respiratory syncytial virus and bovine coronavirus. *Front Vet Sci* 2020;7:167. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00167>.
8. Ellis J. What is the evidence that bovine coronavirus is a biologically significant respiratory pathogen in cattle? *Can Vet J* 2019;60(2):147-152. PMID: 30705449.
9. Smith G, Smith I, Harrower B, Warrilow D, Bletchly C. A simple method for preparing synthetic controls for conventional and real-time PCR for the identification of endemic and exotic disease agents. *J Virol Methods* 2006;135(2):229–234. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.03.007>.
10. Cappellano G, Abreu H, Casale C, Dianzani U, Chiocchetti A. Nano-Microparticle platforms in developing next-generation vaccines. *Vaccines* 2021;9(6):606. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060606>.
11. Parkhe P, Verma S. Evolution, interspecies transmission, and zoonotic significance of animal coronaviruses. *Front Vet Sci* 2021;8:719834. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.719834>.
12. Vlasova AN, Saif LJ. Bovine coronavirus and the associated diseases. *Front Vet Sci* 2021;8:643220. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.643220>.
13. Oma VS, Tråvén M, Alenius S, Myrmel M, Stokstad M. Bovine coronavirus in naturally and experimentally exposed calves; viral shedding and the potential for transmission. *Virol J* 2016;13:1-11. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0555-x>.
14. Kanno T, Ishihara R, Hatama S, Uchida I. A long-term animal experiment indicating persistent infection of bovine coronavirus in cattle. *J Vet Med Sci* 2018;80(7):1134–1137. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0050>.

15. Zhang M, Hill JE, Alexander TW, Huang Y. The nasal viromes of cattle on arrival at western Canadian feedlots and their relationship to development of bovine respiratory disease. *Transbound Emerg Dis* 2021;68:2209–2218. <https://doi.org/10.1111/tbed.13873>.
16. Fulton RW, d’Offay JM, Landis C, Miles DG, Smith RA, Saliki JT, *et al.* Detection and characterization of viruses as field and vaccine strains in feedlot cattle with bovine respiratory disease. *Vaccine* 2016;34(30):3478-3492. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.020>.
17. McDanel TG, Workman AM, Chitko-McKown CG, Kuehn LA, Dickey A, Bennett GL. Detection of *Mycoplasma bovirhinis* and bovine coronavirus in an outbreak of bovine respiratory disease in nursing beef calves. *Front Microbiomes* 2022;1:1051241. <https://doi.org/10.3389/frmbi.2022.1051241>.
18. Frucchi APS, Dall AAM, Bronkhorst DE, Beuttemuller EA, Alfieri AA, Alfieri AF. Bovine coronavirus co-infection and molecular characterization in dairy calves with or without clinical respiratory disease. *Front Vet Sci* 2022;25;9:895492. doi: 10.3389/fvets.2022.895492.
19. O’Neill R, Mooney J, Connaghan E, Furphy C, Graham DA. Patterns of detection of respiratory viruses in nasal swabs from calves in Ireland: a retrospective study. *Vet Rec* 2014;175:351-351. <https://doi.org/10.1136/vr.102574>.
20. Studer E, Lutz S, Mireille M, Dimitri S, Ronald D, Melle H, *et al.* Prevalence of BRD-related viral pathogens in the upper respiratory tract of Swiss veal calves. *Animals* 2021;11(7):1940. <https://doi.org/10.3390/ani11071940>.
21. Paller T, Hostnik P, Pogačnik M, Toplak I. The prevalence of ten pathogens detected by a real-time PCR method in nasal swab samples collected from live cattle with respiratory disease. *Slov Vet Zb* 2017;54(3):101-107. UDC 636.2.09:616.2-002:616.214-076:577.21.
22. Pratelli A, Cirone F, Capozza P, Trotta A, Corrente M, Balestrieri A, *et al.* Bovine respiratory disease in beef calves supported long transport stress: An epidemiological study and strategies for control and prevention. *Res Vet Sci* 2021;135:450-455. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.11.002>.
23. Brito BP, Frost MJ, Anantanawat K, Jaya F, Batterham T, Djordjevic SP, *et al.* Expanding the range of the respiratory infectome in Australian feedlot cattle with and without respiratory disease using metatranscriptomics. *Microbiome* 2023;11(1):158. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01591-1>.

24. Moore SJ, O’Dea MA, Perkins N, O’Hara AJ. 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* 2015;27(1):6-17. doi:10.1177/1040638714559741.
25. Vlasova AN, Saif LJ. Bovine coronavirus and the associated diseases. *Frontiers Vet Sci* 2021;8,643220. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.643220>.
26. Bell RL, Turkington HL, Cosby SL. The bacterial and viral agents of BRDC: immune evasion and vaccine developments. *Vaccines* 2021;9,337. <https://doi.org/10.3390/vaccines9040337>.
27. Hasoksuz M, Hoet AE, Loerch SC, Wittum TE, Nielsen PR, Saif LJ. Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in an Ohio feedlot. *J Vet Diag Invest* 2002;14:30813. doi:10.1177/104063870201400406.
28. Decaro N, Campolo M, Desario C, Cirone F, D’abramo M, *et al.* Respiratory disease associated with bovine coronavirus infection in cattle herds in Southern Italy. *J Vet Diag Invest* 2008;20:28–32. doi:10.1177/104063870802000105.
29. Ambrose RK, Blakebrough-Hall, C Gravel JL, Gonzalez LA, Mahony TJ. Characterisation of the upper respiratory tract virome of feedlot cattle and its association with bovine respiratory disease. *Viruses* 2023;15:455. <https://doi.org/10.3390/v15020455>.
30. Brito BP, Frost MJ, Anantanawat K, Jaya F, Batterham T, *et al.* Expanding the range of the respiratory infectome in Australian feedlot cattle with and without respiratory disease using metatranscriptomics. *Microbiome* 2023;11(1)58;2-17. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01591-1>.