

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**FRECUENCIA DE CORONAVIRUS BOVINO EN BECERRAS DE 9
ESTABLOS LECHEROS DE LA COMARCA LAGUNERA**

**POR:
DANIEL EDUARDO ORTIZ DÍAZ**

TESIS

**PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO.

JUNIO DE 2008

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

TESIS

**FRECUENCIA DE CORONAVIRUS BOVINO EN BECERRAS DE 9
ESTABLOS LECHEROS DE LA COMARCA LAGUNERA**

APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE REVISIÓN

ASESOR PRINCIPAL

M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZALEZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

M.C. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELIAS

**FRECUENCIA DE CORONAVIRUS BOVINO EN BECERRAS DE 9
ESTABLOS LECHEROS DE LA COMARCA LAGUNERA**

TESIS ELABORADA BAJO LA SUPERVISION DEL COMITÉ PARTICULAR DE
ASESORIA Y APROBADA COMO REQUISISTO PARCIAL PARA OBTENER

EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESIDENTE

M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZALEZ

VOCAL

DR. CARLOS LEYVA ORASMA.

VOCAL

M.V.Z. JOSÉ GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ.

VOCAL SUPLENTE

DRA. MARÍA HORTENSIA CEPEDA ELIZALDE.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Resumen	iii
I. Introducción	1
II. Objetivos	2
III. Antecedentes	2
3.1. Historia	2
3.2. Agente etiológico	3
3.2.1. Taxonomía	3
3.2.2. Morfología	5
3.3. Proteínas virales	5
3.4. Lípidos	8
3.5. Replicación viral	9
3.6. Transmisión	10
3.7. Animales susceptibles	10
3.8. Morbilidad y mortalidad	11
3.9. Patogénesis	11
3.10. Signos y lesiones	12
3.11. Diagnóstico	14
3.12. Control y tratamiento	17
IV. Justificación	17
V. Material y métodos	18
VI. Resultados y discusión	21
VII. Conclusiones	24
VIII. Literatura citada	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquematización del virus	7
Figura. 2 Partícula viral de BCV en heces	8
Figura 3. Edad de los animales que presentaron diarrea, asociados con la infección por Coronavirus bovino, en 9 hatos lecheros de la Comarca Lagunera	23
Figura 4. Porcentaje de infección por Coronavirus bovino en becerras de 1 a 35 días de edad, en 9 establos lecheros de la Comarca Lagunera.	24

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Resultados obtenidos de la infección de Coronavirus bovino en 9 establos de la Comarca Lagunera	22
---	----

DEDICATORIAS

A mis Padres:

Crispin Ortiz Daniel

Y

Rosa Díaz Flores

Por ser mi apoyo en la vida, estar siempre a mi lado, brindándome su amor y cariño y pedir a Dios siempre por mí, sin ustedes no estuviera aquí, dando un paso más en la vida y logra una de mis metas. Gracias de todo corazón, y que Dios me los bendiga Hoy y siempre, llenos de salud como hasta ahora.

A mis hermanos y hermanas, que me han apoyado mucho desde el inicio de mi carrera hasta el final, en especial a mi hermano Julio Ortíz, muchas gracias por todo tu apoyo, te lo agradeceré siempre.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por haberme prestado vida en estos años, y darme salud, fuerza, confianza, entendimiento y sabiduría, para lograr concluir mi carrera y cumplir con una meta más en esta vida.

A la universidad “Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna” por haberme brindado los recursos necesarios para que saliera adelante y cumplir mis propósitos.

A mi asesor M.C. Ramón A. Delgado por haberme permitido desarrollar este trabajo y brindarme su apoyo, tiempo, paciencia, y enseñarme lo que es la responsabilidad en el trabajo, muchas gracias.

Al M. V. Z. José Guadalupe Rodríguez, por ayudarme a desarrollar este trabajo, brindarme su ayuda y tiempo, muchas gracias.

Al DR. Carlos Leyva, por ayudarme a concluir mi trabajo, por sus revisiones en la tesis, dándonos de su tiempo, paciencia y conocimientos, gracias.

A mis amigos (as) del grupo F, que los quiero mucho, en especial a las históricas de Alejandra y Rocío, por ser muy buenas compañeras y amigas. A mis demás amigos Leonel y Héctor Manuel, gracias por su amistad. A todos se les estima mucho.

Resumen

La enteritis, es un trastorno que afecta a las becerras de los establos, relacionado con el complejo diarreico de las terneras, éste es un trastorno digestivo que causa pérdidas económicas en los establos lecheros y que afecta a animales desde el nacimiento hasta las 5 semanas de edad.

Para los objetivos de la presente investigación se realizó un muestreo de 9 establos lecheros de la Comarca Lagunera, donde se recolectaron 90 muestras de heces fecales de becerras con presencia de diarrea.

Las muestras se recolectaron en bolsas estériles y se trasladaron al lugar de trabajo en refrigeración, a la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna ubicada en Torreón Coahuila. Se utilizó un paquete comercial de diagnóstico para la detección de antígeno de Coronavirus bovino en heces.

Los resultados obtenidos mostraron que el 100% de los establos lecheros muestreados en la Comarca Lagunera fueron positivos a Coronavirus bovino, el total de muestras 25/90 (27.77%) mostrando una tasa elevada de infección por el virus en las becerras con diarrea.

Abreviaturas

°C: Grados centígrados

BCV: Coronavirus bovino

E: Proteína de membrana integral

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

FIPV: Peritonitis infecciosa felina

HCoV: Coronavirus humano

HE: Proteína hemoaglutinina esterasa

Ig: Inmunoglobulinas

M: Proteína de membrana

N: Proteína nucleocápsida

Nm: Nanometros

ORF: Marco de lectura abierto

PEDV: Diarrea epidémica porcina

pH: Potencial de hidrógeno

RNA: Acido ribonucleico

RNP: Ribonucleoproteína interna

S: Proteína de unión

TGEV: Gastroenteritis transmisible del cerdo

µl: Microlitros

I. Introducción

En el ganado, las enfermedades entéricas son un problema de salud importante asociadas con diarreas, deshidratación y pérdida de peso. La severidad de la diarrea dependen del agente causante que puede incluir un cierto número de entero-patógenos como bacterias, virus, protozoarios, y su interacción con el medioambiente, manejo y factores del hospedero (inmunosupresión, mal nutrición y el estrés) (Hoet *et al.*, 2003).

Los coronavirus son causantes de enfermedades entéricas y respiratorias, afectando a muchos animales domésticos y salvajes, incluyendo al humano (Siddell *et al.*, 1983; Chouljenko *et al.*, 2001; Weiss, 2005; Hasoksuz *et al.*, 2007; Tusell *et al.*, 2007; Vijaykrishna *et al.*, 2007; Ye, *et al.*, 2007).

El coronavirus representan un grave problema, ya que, produce una gran perdida económica, sobre todo por las diarreas infecciosas que van de leve a severas, además de los problemas respiratorios agudos o crónicos (Ye *et al.*, 2007); que presenta y más aun si se pierde al becerro por cuestiones de muerte, resultando en pérdidas de más de 1.7 billones de dólares en el mundo entero (Dea *et al.*, 1979; Tahir *et al.*, 1995; Gaber, 1999; Schoenthaler, 1999; Yoo, 2001; Hasoksuz *et al.*, 2002).

Existen varias pruebas de diagnóstico de laboratorio para determinar la presencia de Coronavirus, como son: Observación al microscopio, inmunofluorescencia, histología y ELISA (Dea *et al.*, 1979; Tahir *et al.*, 1995; Gaber, 1999; Schoenthaler, 1999; Yoo, 2001; Hasoksuz *et al.*, 2002).

Debido a estos antecedentes, es importante conocer la prevalencia de coronavirus bovino en las enfermedades entéricas de las becerras de la Comarca

Lagunera debido a que no hay estudios en la región. Por tal motivo la finalidad de este trabajo es investigar la frecuencia de Coronavirus en becerras con diarrea.

II. Objetivos

Objetivo general.

- Investigar la prevalencia de la infección causada por Coronavirus bovino en el síndrome diarreico de las terneras en 9 hatos lecheros de bovinos Holstein de la Comarca Lagunera.

Objetivo específico.

- Utilizar la técnica inmunoabsorbente ligada a enzimas (ELISA) para identificar antígeno del coronavirus en heces de becerras lactantes con diarrea.
- Conocer con exactitud la prevalencia de coronavirus en crianza de becerras Holstein con síndrome diarreico.

III. Antecedentes

3.1. Historia

El nombre “coronavirus” acuñado en 1968, es derivado de la forma de corona o parecido a una corona al ser observado en la morfología de estos virus en el microscopio electrónico (Alonso *et al.*, 2002). Los mecanismos moleculares de replicación así como la patogénesis de varios coronavirus han sido activamente estudiados, así como el enteropatógeno bovino que fue primeramente reconocido en la década de los 1970's, al ser aislado de muestras de diarreas de terneros neonatos con gastroenteritis severa (Lin *et al.*, 2001;

Alonso *et al.*, 2002). El coronavirus bovino fue reconocido como una causa potencial de diarrea en los becerros recién nacidos hasta 1972 (Hasoksuz *et al.*, 2002). En 1975, la familia *Coronaviridae* fue establecida por el Comité Internacional de la Taxonomía de los Virus (Weiss, 2005).

Los primeros aislamientos de coronavirus en lavado de pulmón y muestras nasofaríngeas de becerros ocurrieron en 1982 e involucraron dos brotes de neumonía (Hasoksuz *et al.*, 2002).

En el Laboratorio de salud animal en Wisconsin durante 1993-1994, el coronavirus bovino (BCV) fue detectado en 93 casos de becerros afectados de 1058 muestras fecales de becerros, examinadas por microscopio electrónico (Kapil *et al.*, 1996).

Recientemente, en el X Simposio Internacional de Nidovirus en el Muelle de Colorado, Colo., en junio de 2005 propuso que la familia *Coronaviridae* fuera dividida en dos subfamilias, los coronavirus y los torovirus (Weiss, 2005).

3.2. Agente Etiológico

3.2.1. Taxonomía

La familia *Coronaviridae*, junto con las familias *Arteriviridae* y *Roniviridae* forman el orden de los *Nidovirales* (Lin *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2001; Ozdarendeli *et al.*, 2001; Yoo, 2001; Hasoksuz *et al.*, 2002; Weiss, 2005; Park *et al.*, 2006; Vijgen *et al.*, 2006; Hasoksuz *et al.*, 2007; Vijaykrishna *et al.*, 2007). La familia *Arteriviridae* incluye patógenos de los cerdos y equinos, y la familia *Roniviridae* es compuesto por virus de invertebrados (Weiss, 2005; Han *et al.*, 2006).

Los coronavirus son divididos en tres géneros (I al III) (Han *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006) normalmente referidos como grupos y clasificados basados en

la reactividad serológica cruzada; y similitudes genéticas y antigénicas (Liu *et al.*, 2006; Hasoksuz *et al.*, 2007; Vijgen *et al.*, 2006; Vijaykrishna *et al.*, 2007) el más reciente análisis de la secuencia genómica ha confirmado esta agrupación (Weiss, 2005; Han *et al.*, 2006).

El grupo I de coronavirus incluye patógenos de animales, tal como la gastroenteritis transmisible del cerdo (TGEV) virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) y el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV) así como el coronavirus humano HCoV-229E y HKU1, que causa infecciones respiratorias (Weiss, 2005; Han *et al.*, 2006; Tusell *et al.*, 2007).

El grupo II incluye patógenos de relevancia veterinaria, como el coronavirus bovino (BCV) (Han *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006; De Diego *et al.*, 2007; Hasoksuz *et al.*, 2007) virus de la encefalomiелitis hemoaglutinante porcina, y coronavirus equino, así como coronavirus humano, (y otros virus OC43 y NL63, HCoV229E) que también causan infecciones respiratorias. Éste grupo, también incluye virus que infectan tanto a ratones como a ratas, virus de la hepatitis en ratones y ratas (Weiss, 2005; Liu *et al.*, 2006; Vijgen *et al.*, 2006; Hasoksuz *et al.*, 2007; Tusell *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2007).

Un rasgo característico del grupo II es la presencia de una codificación genética, la proteína hemoaglutinina-esterasa, la cual esta ausente en otros grupos (Liu *et al.*, 2006).

El grupo III hasta ahora incluye sólo el coronavirus Aviar, coronavirus de los pavos y coronavirus del faisán. Recientemente, detectada en gansos (*Anas anser*) paloma salvaje (*Columba livia*) y ánade real (*Anas platyhynchos*) análisis filogenético sugieren que estos virus son miembros del grupo III, pero aun ellos no han sido aislados y caracterizados (Weiss, 2005).

3.2.2. Morfología

Los coronavirus son virus envueltos (Siddell *et al.*, 1983; Gaber, 1999; Lin *et al.* 2001; Yoo, 2001; Han *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2006; Vijgen *et al.*, 2006; Hasoksuz *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2007) redondos (Dea *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006) y algunos pleomórficos de aproximadamente 80 a 120 nm de diámetro (Milane *et al.*, 1997; Weiss, 2005; Hasoksuz *et al.*, 2007) con proyecciones superficiales en forma de palo de aproximadamente 20 nm de longitud (Siddell *et al.*, 1983) y con 31, 043 nucleótidos (Yoo, 2001).

Las ribonucleoproteínas internas (RNP) componente de los coronavirus han sido visualizadas como un hilo largo de 1 a 2 nm de diámetro o como una RNP helicoidal condensada en las estructuras espirales que varían de diámetro, normalmente de 10 a 20 nm (Siddell *et al.*, 1983).

3.3. Proteínas virales

Cinco proteínas: Dentro del RNA genómico se codifican la glicoproteína punto de unión (S) proteína de membrana (M) proteína de la nucleocápsida (N) proteína hemoaglutinina esterasa (HE) y la recientemente identificada proteína E, y proteínas no estructurales no conocidas o menos caracterizadas (Dea *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2001; Yoo, 2001; Feber *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006; De Diego *et al.*, 2007) (Figura 1).

Además, del RNA el coronavirus contiene en la nucleocápsida una proteína no-glicosilatada (Siddell *et al.*, 1983; Arthington *et al.*, 2002). Ésta proteína es fosforilatada y purificada en los virus (Siddell *et al.*, 1983).

La membrana de todos los coronavirus da al virus una forma de corona o morfología parecida a una corona en el microscopio electrónico (Lin *et al.*, 2001; Yoo, 2001; Liu *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2007).

Las proteínas S, tiene varias funciones importantes durante la interacción virus - huésped (Dea *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 2001; Yoo, 2001; Liu *et al.*, 2006) asociadas con la vinculación de las células receptoras del hospedero, y la fusión de membranas virales y celulares. Así, la proteína S es importante para la entrada de los virus y la patogénesis de los coronavirus (Lin *et al.*, 2001; Yoo, 2001; Liu *et al.*, 2006).

Otra importancia de las proteínas S es su antigenicidad. Los anticuerpos inducidos por las proteínas S son sumamente neutralizados y son muy estables durante el curso de una infección que aquellos inducidos por la proteína hemoaglutinina-esterasa (Lin *et al.*, 2001; Yoo, 2001; Liu *et al.*, 2006).

La proteína de membrana (M) (25k) (Milane *et al.*, 1997; Yoo, 2001) es la más abundante de las proteínas del virus. Aparte de su papel en la infección del virus, las proteínas M de los coronavirus, tienen funciones en interacciones con el hospedero. Si bien la glicosilación no es esencial para la infección viral, el estado de glicosilación de la proteína M probablemente desempeña una interacción virus-hospedero y una proteína de membrana pequeña (E) (Yoo, 2001; Ye *et al.*, 2007).

La proteína E de los coronavirus son una proteína de la membrana integral (Lin *et al.*, 2001). Junto con la proteína M, la E juega un papel importante en la infección viral (Ye *et al.*, 2007) éstas proteínas , son expresadas solas o son expresadas junto a las M, con formas particulares parecidas a virus (Siddell *et al.*, 1983).

Una proteína de membrana adicional, hemoaglutinina esterasa (HE) (Dea *et al.*, 1995; Milane *et al.*, 1997; Arthington *et al.*, 2002; Weiss, 2005). Si bien la función de la HE no es conocida, esta no es una proteína esencial, y ha sido especulado que ayuda en la entrada viral y/o patogénesis (Lin *et al.*, 2000; Weiss, 2005).

El coronavirus se fija a un receptor celular específico por medio de las proteínas de unión. La proteína de unión del coronavirus juega un papel vital en la entrada viral, propagación de célula a célula, y determina el tropismo del tejido. La entrada del coronavirus es, en general, no dependiente del pH, y por esto se ha creído que esto ocurre directamente en la membrana plasmática y no por vía y ruta endosomal. Sin embargo, hay datos que sugieren que la ruta endosomal puede ser utilizada por algunos virus (Weiss, 2005).

Hay un grupo II adicional de proteína llamada viral interna, que es codificada dentro de la nucleocápsida en el marco de lectura abierto (ORF). Esta es una proteína no esencial de función desconocida (Ozdarendeli *et al.*, 2001; Weiss, 2005).

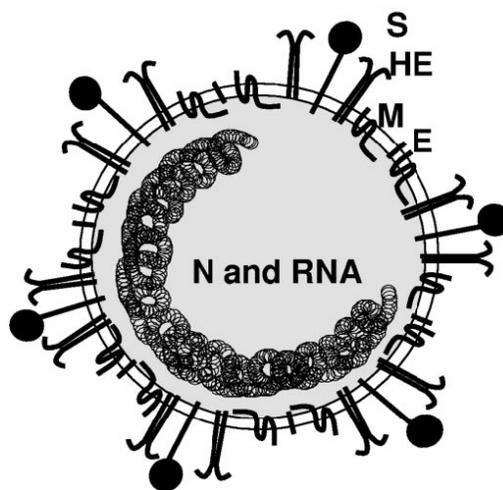


Figura 1. Esquemización del Virus. N: Nucleocápsida, Glicoproteína de unión (S) proteína transmembrana (M) una pequeña proteína que atraviesa la membrana (E) y la Hemoaglutinina esterasa (HE) (Weiss, 2005).

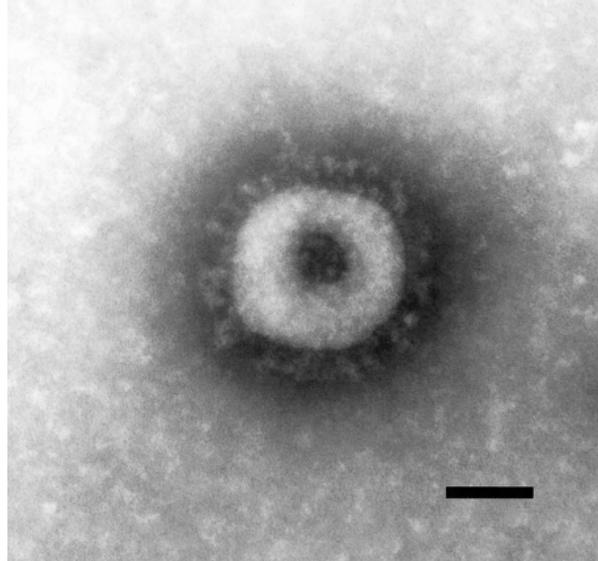


Figura 2. Partícula viral de coronavirus en heces fecales, observada al microscopio electrónico (Wünschmann *et al.*, 2002).

3.4. Lípidos

Los virus envueltos contienen fosfolípidos, glicolípidos, colesterol, di y triglicéridos y tres ácidos grasos en proporciones aproximadamente correspondiendo a aquellos en la membrana celular. El colesterol y los ésteres de ácidos grasos presentes en las membranas celulares son selectivos agotándose en la membrana del virus. Cuando crecen en diferentes tipos de célula el virus envuelto refleja el lípido contenido en la membrana celular del hospedero (Siddell *et al.*, 1983).

3.5. Replicación viral

Los coronavirus se adjuntan a receptores celulares específicos por medio de las proteínas de unión (S); esto provoca un cambio de conformación en el punto de unión que luego medía la fusión entre el virus y las membranas celulares que causan la liberación de la nucleocápsida dentro de la célula (De Diego, et al., 2007)

Los estudios morfogénicos sobre la maduración de los coronavirus han revelado que la infección está restringida al citoplasma donde la progenie de los virus son formados por un proceso en ciernes de las membranas del retículo endoplásmico rugoso. Los virus adquieren su envoltura lípida de las células, excluyendo las proteínas de las células del hospedero en el proceso, y son transportadas subsecuentemente a través y acumuladas en el complejo de Golgi y alisa las vesículas de las paredes (Siddell *et al.*, 1983).

Las proteínas M y E, expresadas en la ausencia de otras proteínas virales y virus de RNA, son suficientes para producir partículas parecidas a virus. La proteína de unión es distribuida en membranas intracelulares así como en la membrana plasmática. La proteína de unión interactúan con la región transmembrana de la proteína M durante la infección. Para algunos virus, el punto medio de fusión ocurre de célula a célula, así promoviendo la formación y propagación de sincitios virales (Weiss, 2005).

3.6. Transmisión

Los coronavirus están distribuidos en todo el mundo. En muchos casos éstos se replican en las vías respiratorias y la transmisión del virus usualmente es por este sitio, aunque los virus son también almacenados o alojados en las heces fecales. La mayor parte de los coronavirus causan enfermedades clínicas en las especies de las cuales fueron aislados por transmisión natural y experimental a otras especies (Siddell *et al.*, 1983).

El modo de infección es frecuentemente por vía oral, la infección entérica y por vía nasal, la infección respiratoria por BCV ya ha sido demostrada y es importante a nivel de campo (Arthington *et al.*, 2002; Hasoksuz *et al.*, 2007).

El coronavirus, como otras especies de RNA, representa una cuasiespecie, aumentando la posibilidad de mutaciones adaptables y la transmisión inter-especies (Han *et al.*, 2006; Hasoksuz *et al.*, 2007; Vijaykrishna *et al.*, 2007).

También puede ocurrir una transmisión de animal a humano con virus muy virulentos (Ye *et al.*, 2007).

3.7. Animales susceptibles

Los coronavirus afectan a un amplio rango de especies, como son vacas, cerdos, perros, gatos, caballos, ratones, pollos e inclusive humanos (Han *et al.*, 2006).

El coronavirus no solo afecta a los animales domésticos, sino también, a animales silvestres como es el caso de los alces (Majhdi *et al.*, 1997) los camellos (*Camelus dromedarios*) y cebras (Wûnschmann *et al.*, 2002).

El coronavirus bovino afecta a los establos lecheros y productores de carne y es muy común en los becerros de 1 a 2 semanas de edad (Arthington *et al.*, 2002) inclusive afecta animales mayores de 4 semanas de edad hasta 16 semanas (Tahir *et al.*, 1995; Gaber, 1999).

El coronavirus bovino fue primeramente asociado con la diarrea en becerros recién nacidos y después con la disentería de invierno en el ganado adulto (Tahir *et al.*, 1995; Milane *et al.*, 1997; Yoo, 2001; Liu *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006).

3.8. Morbilidad y mortalidad

Las infecciones por coronavirus bovino a menudo resultan en alta morbilidad pero usualmente en baja mortalidad (Liu *et al.*, 2006).

Los rangos de morbilidad en los becerros que ocurren naturalmente por la infección de BCV pueden ser altos de un 15 a 25% (Arthington *et al.*, 2002).

Los porcentajes de mortalidad para los coronavirus en los becerros están estimados en un 20 a 26%, en todos los casos de diarrea (Dar *et al.*, 1998).

3.9. Patogénesis

Los coronavirus primeramente infectan el sistema respiratorio o el tracto gastrointestinal. Estas infecciones son generalmente agudas y es probable que una infección lítica que destruye las células del hospedero sea el mecanismo básico patogénico involucrado. La infección respiratoria está usualmente limitada al epitelio ciliar de la tráquea, mucosa nasal y células alveolares de los pulmones. Una respuesta inmune local la causa la secreción de IgA la cual es normalmente suficiente para vencer a la fase aguda de la enfermedad y el desarrollo de una

inmunidad sistémica humoral obstaculiza la invasión severa de los organismos. Los coronavirus enteropatógenos tienen selección de infección a células de absorción y células de las criptas de la mucosa intestinal resultando en atrofia de las vellosidades (Siddell *et al.*, 1983).

Las cepas de los virus se diferencian por su predilección por un sitio en particular (intestino delgado y grueso, colon) (Kapil *et al.*, 1996; Milane *et al.*, 1997) y tipo celular (epitelio absortivo y /o células de las criptas) (Siddell *et al.*, 1983; Dar *et al.*, 1998) y la severidad de la enfermedad varía de intensidad, de una enteritis transitoria a una diarrea fatal que progresa rápidamente. Como con las infecciones respiratorias, la respuesta local inmune proporciona la línea más importante de defensa en contra de la infección entérica (Siddell *et al.*, 1983).

La enfermedad es iniciada por una infección inaparente de las vías respiratorias, tonsilas e intestinos, que se extiende a lo largo de las vías nerviosas a los ganglios periféricos y sistema nervioso central. Posteriormente, la infección de neuronas que regulan las funciones peristálticas del tracto intestinal causa la enfermedad y animales jóvenes en particular pueden morir de hambre (Siddell *et al.*, 1983). Se replica en los enterocitos diferenciados del intestino delgado y grueso, causando diarrea severa en becerros recién nacidos (Milane *et al.*, 1997).

3.10. Signos y Lesiones.

El coronavirus bovino es un virus neuromoentérico que causa diarreas severas en becerros neonatos, disentería en invierno, y enfermedades respiratorias en el ganado (Tahir *et al.*, 1995; Milane *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Dar *et al.*, 1998; Gaber, 1999; Schoenthaler, 1999; Lin *et al.*, 2001; Yoo,

2001; Hasoksuz *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006; Hasoksuz *et al.*, 2007).

Los coronavirus causan una variedad de diferentes signos clínicos (infecciones respiratorias, gastroenteritis, desórdenes hepáticos y neurológicos, y nefritis) secreciones nasales así como por heces fecales (Schoenthaler, 1999; Chouljenko *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2006) en un amplio rango de especies (Han *et al.*, 2006; Vijaykrishna *et al.*, 2007).

Clásicamente, los signos clínicos característicos en un inicio agudo son ceguera, sangrado, diarrea líquida en las vacas adultas, acompañada por una disminución en la producción de leche, depresión y anorexia (Dea *et al.*, 1995; Milane *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Arthington *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2006).

Se ha asociado recientemente con la enfermedad del complejo respiratorio bovino en el ganado de engorda, infectando principalmente al intestino delgado y grueso de los becerros (Milane *et al.*, 1997; Yoo, 2001; Hasoksuz *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006; Hasoksuz *et al.*, 2007).

Las diferencias de signos clínicos también podrían depender en factores del hospedador (Liu *et al.*, 2006).

En los alces causa enteritis, neumonías intersticiales, siendo causas de muertes en éstos animales (Majhdi *et al.*, 1997). En camellos y cebras hay enteritis, con diarrea líquida y por consecuencia una deshidratación (Wünschmann *et al.*, 2002).

3.11. Diagnóstico

El coronavirus bovino es un virus ubicuo en todo el mundo, medido por serología. Estudios epidemiológicos sugieren que los anticuerpos en el suero tienen correlación con la inmunidad (Weiss, 2005).

Anteriormente, el diagnóstico de las infecciones por coronavirus bovino era hecho mediante la identificación del virus en las heces. Debido a que el aislamiento de coronavirus bovino en cultivos celulares es difícil, este método es raramente empleado como una prueba de diagnóstico (Zhang *et al.*, 1997).

También la identificación de los coronavirus se realizaba mediante la tinción de inmunofluorescencia de secciones del colon, éste era el método de diagnóstico elegido por muchos laboratorios (Dea *et al.*, 1979; Zhang *et al.*, 1997; Dar *et al.*, 1998). Desafortunadamente, este método ha sido usado solamente después de la muerte de los becerros o sacrificando un becerro para propósitos de diagnóstico (Dea *et al.*, 1979).

La técnica de inmunofluorescencia a partir de cortes de tejidos congelados, es rápida y simple cuando es comparada con el aislamiento del virus y la observación con el microscopio electrónico y es comúnmente utilizada para la detección de muchos virus de interés veterinario. Sin embargo, el éxito de la aplicación de esta técnica requiere de transportación rápida de las muestras frescas para el diagnóstico de laboratorio y atención en el cuidado de manejo, toma de muestras y envío de las mismas refrigeradas. Otro problema asociado con esta técnica es que no tiene fluorescencia específica. Otra dificultad encontrada en esta técnica de diagnóstico incluye la necesidad de personal capacitado (Dar *et al.*, 1998).

La observación al microscopio electrónico es el métodos mas utilizados ampliamente para el diagnóstico de BCV en heces (Tahir *et al.*, 1995; Kapil *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997). Los resultados de la observación al microscopio electrónico pueden ser examinados a las pocas horas, una característica común en enteritis, puede ser detectada simultáneamente (Kapil *et al.*, 1996). Pero la técnica ha sido limitada para la detección de partículas no virales ya que estas pueden observarse como coronavirus y detectar solamente virus cuando el número de éstos son altos en las heces fecales (Dar *et al.*, 1998; Kapil *et al.*, 1996).

Después del inicio de la diarrea, la cantidad de BCV en las heces puede caer rápidamente por debajo de los límites de detección para la observación al microscopio (Zhang *et al.*, 1997; Dar *et al.*, 1998).

Se han utilizado muchas técnicas de ELISA para la detección de antígenos de coronavirus en heces. ELISA es a menudo preferida sobre la observación al microscopio por que ésta es más rápida y un gran número de muestras pueden ser examinadas en un periodo de tiempo relativamente corto. Sin embargo, la técnica de ELISA le falta sensibilidad cuando se compara con estudios similares con otros patógenos entéricos (Zhang *et al.*, 1997; Dar *et al.*, 1998; Schoenthaler, 1999).

La tecnología de Anticuerpos Monoclonales ha facilitado el desarrollo de pruebas sensibles y específicas para la identificación de muchos antígenos virales en muestras clínicas (Zhang *et al.*, 1997). Varias técnicas inmunológicas que incorporan el uso de anticuerpos monoclonales, han sido descritas, incluyendo pruebas de ELISA (Dar *et al.*, 1998) pruebas de fluorescencia de anticuerpos

directa e indirectamente e inmunohistoquímica (Zhang *et al.*, 1997; Dar *et al.*, 1998; Gaber, 1999).

El uso de anticuerpos monoclonales, más que los anticuerpos policlonales, ha aumentado la sensibilidad y especificidad de ELISA para BCV (Zhang *et al.*, 1997).

La técnica de ELISA se ha modificado agregando antígenos que permiten el diagnóstico de la diarrea indiferenciada de las terneras. Para ello se utiliza una mezcla de tres anticuerpos monoclonales específicos para detectar antígenos de Rotavirus, coronavirus y *E. coli* K99 (Czerny, 1989; Thorns *et al.*, 1992).

Si bien el aislamiento de virus es un método sensible para la detección de virus animales, el sistema de cultivo celular no está actualmente disponible (Dar *et al.*, 1998) y muy pocas veces es usado para la detección de BCV debido al mal crecimiento de los virus en el cultivo celular (Tahir *et al.*, 1995). Además, el aislamiento de virus consume tiempo y trabajo intensivo (Dar *et al.*, 1998).

Estudios recientes han mostrado el uso de anticuerpos para detectar antígenos virales en tejido incluidos en parafina, para la examinación histológica a través de la aplicación del método de inmunohistoquímica (Zhang *et al.*, 1997; Dar *et al.*, 1998).

Cuando los intestinos solo son sometidos a la fijación con formalina, el diagnóstico de infecciones por coronavirus bovino es difícil, y más, cuando las lesiones de la infección no son específicas (Zhang *et al.*, 1997).

3.12. Control y Tratamiento

Se ha demostrado que el suero bovino es una fuente efectiva de Ig exógena pasiva para los becerros recién nacidos. Algunos estudios, muestran que las Ig extraídas del suero han sido ofrecidas después del nacimiento, cuando los epitelios intestinales de los becerros son permeables a las proteínas de grande peso molecular. Por consiguiente, las Ig extraídas del suero se absorben y llegan a la circulación sanguínea. En contraste, el uso de suero bovino, en los becerros mayores, experimentan trastornos entéricos, cuando reciben poca atención. En otros estudios, los becerros que se les ofreció plasma bovino tuvieron igual mejoría en actitud, hidratación y ganancia de peso corporal que los becerros tratados con antibióticos. Las infecciones virales tales como BCV no son tratables con antibióticos, excepto para combatir las infecciones bacteriales secundarias. La asistencia de apoyo y terapia de electrolitos para intentar la recuperación de los fluidos perdidos y prevenir la deshidratación a menudo son solamente los tratamientos disponibles (Arthington *et al.*, 2002).

IV. Justificación

De acuerdo con la literatura citada en este trabajo y tomando en cuenta que en la Comarca Lagunera no hay estudios suficientes sobre el diagnóstico etiológico de la diarrea de las terneras en bovinos Holstein y considerando que en la región, en los laboratorios de diagnóstico y en la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, se ha diagnosticado la infección por coronavirus, se considera importante investigar la prevalencia de la enfermedad involucrada con el complejo diarreico de las terneras, en establos de la Comarca Lagunera.

V. Material y Métodos

Se llevó a cabo un estudio dirigido y por conveniencia en dos fases:

Fase de campo.

Se estudiaron las áreas de crianza de 9 establos lecheros de la Comarca Lagunera y se tomaron muestras de heces de becerras con signos clínicos de diarrea. Las muestras se colectaron directamente del ano estimulando para obtener las heces líquidas y se depositaron en bolsas de plástico estériles, se identificaron y se remitieron en refrigeración inmediatamente al lugar de trabajo. En siete establos se tomaron muestras de 10 animales cada uno, un establo con 15 muestras y otro con 5 muestras dando un total de 90 muestras de heces. Estas muestras fueron tomadas a finales de la estación de otoño entre los días 5 y 17 del mes de diciembre de 2007, en las primeras horas del día.

Marco de Referencia

El Municipio de Torreón se localiza en la parte oeste del sur del estado de Coahuila, en las coordenadas 103° 26' 33" longitud oeste y 25° 32' 40" latitud norte, a una altura de 1,120 msnm. Limite al norte al este con el municipio de matamoros y al sur y al oeste con el estado de Durango.

La Comarca o Región Lagunera (La Laguna) esta ubicada en la parte centro norte de la republica mexicana en los límites del estado de Coahuila y Durango. Se encuentra a una altitud de 1,120 msnm, a una altitud de 24° 22' norte, a una longitud de 102° 22' Oeste, cuenta con una extensión de 44,887 km² y se encuentra conformado por 15 municipios, de los cuales 10 pertenecen a Durango, Gómez Palacio, Lerdo, Tlahualilo, Mapimi, Rodeo, Nazas, Simón Bolivar, San Juan de Guadalupe, San Luís del Cordero y San Pedro del Gallo; y

cinco municipios pertenecen a Coahuila: Torreón, San Pedro, Matamoros, Francisco I Madero y Viesca.

La Región Lagunera colinda al norte con el estado de Chihuahua y los municipios de Sierra Mojada y Cuatrociénegas del Estado de Coahuila, al oeste con los municipios de Inde y Villa Hidalgo del Estado de Durango, al Sureste con el Estado de Zacatecas y al este con el Municipio de Parras, Coahuila.

Fase de laboratorio

El estudio se realizó en la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna ubicada en Torreón Coahuila. Se utilizó un paquete comercial de diagnóstico para la detección de antígeno de coronavirus bovino en heces, El paquete permaneció almacenado en refrigeración a una temperatura de 4 a 8 °C, y se puso a temperatura ambiente para trabajar. Se utilizó una hoja de trabajo (placa) como la siguiente:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N	N	N									
B	P	P	P									
C	M1											
D	M2											
E	M3											
F	M4											
G	M5											
H	...											

Se diluyó un medio del reactivo control negativo, un medio del reactivo control positivo y un medio de materia fecal con otro medio de un diluyente amortiguado con fosfatos como se observa en la nota siguiente:

50µl de diluyente amortiguado con fosfatos.

50µl de diluyente control negativo en los pocillos A1, A2 y A3.

50µl de diluyente control positivo en los pocillos B1, B2 y B3.

50µl del diluyente de muestras analizadas por pocillo

Cuando la muestra no se pudo homogenizar se utilizaron perlas de vidrio dentro del recipiente y se diluyeron agitando vigorosamente, se colocaron los 100 μ l en cada pocillo, se cubrió la placa con una lámina de aluminio y se dejó incubando a 21 °C \pm (5°C) durante 30 minutos.

Se preparó una solución concentrada (X20) de lavado 1:20 con agua destilada, eliminando los cristales que se forman a 5°C (\pm 3°C).

Se llenaron los pocillos de la placa con 300 μ L de la solución de lavado, se vació el líquido de la placa con un golpe sobre una superficie firme con tela absorbente y se repitió este paso con un total de 3 lavados, evitando la formación de burbujas.

Se depositaron en cada pocillo 100 μ L de conjugado (Anticuerpo anti IgG) y se dejó incubar la placa a 21°C (\pm 5°C) durante 30 minutos (\pm 3min).

Se llenaron los pocillos de la placa con 300 μ L de la solución de lavado, se vació el líquido de la placa con un golpe sobre una superficie firme con tela absorbente y se repitió este paso con un total de 3 lavados, evitando la formación de burbujas.

Se depositaron 100 μ L de solución reveladora y se incubaron durante 10 minutos a 21°C \pm 5 °C fuera de la luz.

Criterios de validación.

El resultado fue considerado positivo cuando:

- A) El control positivo presentó un color amarillo bien marcado.
- B) El control negativo no presenta color o un color amarillo ligero.

Interpretación.

La placa es validada cuando:

A) Se consideró como positiva cualquier muestra que presente un color amarillo, que fuera más oscuro que el color del control negativo.

B) Se consideró como negativa cualquier muestra que presentó un color amarillo equivalente o ligeramente menor que el control negativo.

VI. Resultados y Discusión

El coronavirus en bovinos produce diarreas infecciosas, y además pueden asociarse con problemas respiratorios, causando pérdidas económicas por mortalidad, tratamiento y pérdida de reemplazos.

En un estudio retrospectivo de 1995 a 1999 en la Comarca Lagunera, se reportaron lesiones características de enteritis necróticas compatibles con infecciones causadas por Rotavirus y Coronavirus, en un 49% de intestinos observados histológicamente (Delgado, 2000). En el presente estudio éstos porcentajes, analizados con la técnica de ELISA, muestran valores de 27.7% en Coronavirus (Cuadro 1). Estos resultados nos indican que a pesar de tener una vacunación contra éste virus, el agente se sigue manifestando.

Cuadro 1. Resultados obtenidos de la infección de Coronavirus bovino en 9 establos de la Comarca Lagunera.

Establo	n	n (+)	% de infección	Edad (Días)
1	10	1	10	3-19
2	10	3	30	5-35
3	10	1	10	4-25
4	10	2	20	8-20
5	10	5	50	1-10
6	10	7	70	5-20
7	15	3	20	1-8
8	5	1	20	9-24
9	10	2	20	1-5
Total: 9	Total:90	Total: 25	27.7%	Rango: 1-35

De las 90 muestras corridas, se obtuvieron 25 (27.7%) con infección por Coronavirus bovino, afectando a la mayor parte a las becerras de entre 5 y 12 días de edad (Cuadro 1, Figura 3) encontrando que la infección fue mayor en animales de éstas edades, en forma similar Arthington *et al.*, (2002) encontraron que la infección ocurrió de la primera a la segunda semana de edad de la becerria, y Gaber (1999) reportó resultados de infección que van de la primera hasta la sexta semana de edad, mientras que Tahir *et al.*,1995 y Dar *et al.*, 1998 muestran que la infección llegó a ocurrir entre la segunda y dieciséis semanas de edad, éstos tres últimos autores muestran un rango de infección mucho más amplio, que el encontrado en éste trabajo.

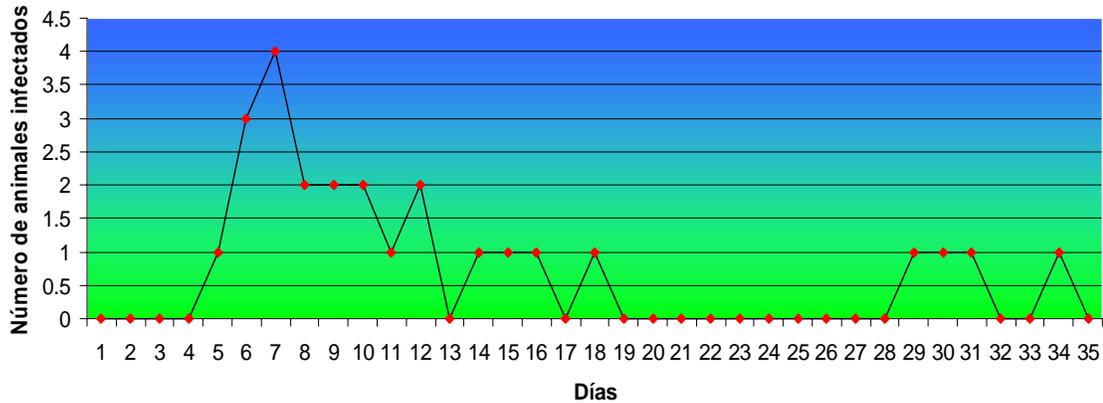


Figura 3. Edad de los animales que presentaron diarrea, asociados con la infección por Coronavirus bovino, en 9 hatos lecheros de la Comarca Lagunera.

En los 9 establos muestreados estuvo presente el Coronavirus, en al menos un caso, mostrando un 100% de infección, (Figura 4). Una cuestión que se plantean es el porqué aún estando vacunadas las beceras, se presenta la infección, ya que en algunos establos de los que se obtuvieron muestras, se tomaron de animales que estaban ya vacunados y presentaron diarreas, al hacer la prueba de ELISA, algunas muestras salieron positivas a coronavirus, además, los rangos de porcentajes que se muestran de un establo a otro (10 - 70%) son muy amplios y esto es posible que sea debido a una mala aplicación de las vacunas en las madres, aunado a un mal manejo de las vacunas, ya que en ocasiones se pierde la cadena fría que puede inactivar al antígeno que se está aplicando; o también por el manejo del calostro considerando la calidad, cantidad y tiempo de administración. La calidad del calostro, es muy importante, ya que éste dará protección a la beceras, proveyéndola de anticuerpos y nutrientes, para un óptimo desarrollo y protección contra enfermedades.

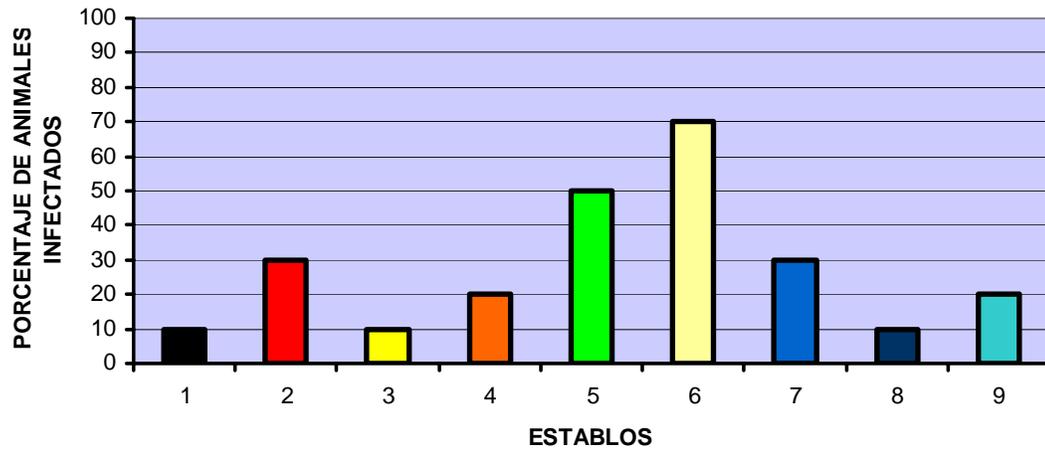


Figura 4. Porcentaje de infección por Coronavirus bovino en becerras de 1 a 35 días de edad, en 9 establos lecheros de la Comarca Lagunera.

VII. Conclusiones

El Coronavirus bovino se encuentra involucrado en el Síndrome Diarreico de las Terneras en los hatos lecheros de bovinos Holstein de la Comarca Lagunera.

La prevalencia de la infección por Coronavirus bovino en becerras con diarrea de la Comarca Lagunera es de 27.7%, considerándose alta.

Que el rango de edades de mayor susceptibilidad a Coronavirus bovino en becerras fue entre 5 y 12 días.

Las diferencias de manejo entre establos, fue un factor de variabilidad en la prevalencia de éste agente patógeno.

VIII. Literatura citada

- Alonso, S., A. Izeta., I. Sola., L. Enjuanes. (2002). "Transcription Regulatory Sequences and mRNA Expression Levels in the Coronavirus Transmissible Gastroenteritis Virus." Journal Of Virology 76(3): 1293–1308.
- Arthington, J. D., C. A. Jaynes., H. D. Tyler., J.D. Quigley. (2002). "The Use of Bovine Serum Protein as an Oral Support Therapy Following Coronavirus Challenge in Calves." Journal Dairy Science 85: 1249–1254.
- Czerny, C. P. and W. Eichhorn (1989). "Characterization of monoclonal and polyclonal antibodies to bovine enteric coronavirus: establishment of an efficient ELISA for antigen detection in feces." Vet Microbiol 2: 111-122.
- Chouljenko, V. N., Q. Lin., J. Storz., K. G. Kousoulas., A. E. Gorbalenya. (2001). "Comparison of genomic and predicted amino acid sequences of respiratory and enteric bovine coronaviruses isolated from the same animal with fatal shipping pneumonia." Journal of General Virology 82: 2927–2933.
- Dar, A. M., S. Kapil., S. M. Goyal. (1998). "Comparison of immunohistochemistry, electron microscopy, and direct fluorescent antibody test for the detection of bovine coronavirus." Journal Veterinary Diagnostic investigated 10: 152–157.
- De Diego, M. L., E. Álvarez., F. Almazan., M. T. Rejas., E. Lamirande., A. Roberts., W. J. Shieh., S. R. Zaki., K. Subbarao., L. Enjuanes. (2007). "A Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus That Lacks the E Gene Is Attenuated In Vitro and In Vivo." Journal of virology 87: 1701-1713.
- Dea, S., L. Miehaud., G. Milane. (1995). "Comparison of bovine coronavirus isolates associated with neonatal calf diarrhoea and winter dysentery in adult dairy cattle in Quebec." Journal of General Virology 76: 1263 1270.
- Dea, S., R. S. Roy., M. E. Begin. (1979). "Counter immunoelectroosmophoresis for Detection of Neonatal Calf Diarrhea Coronavirus: Methodology and Comparison with Electron Microscopy." Journal Of Clinical Microbiology 10: 240-244.

- Delgado, G. R. (2000). "Diarrea de las terneras en bovinos Holstein de la Comarca Lagunera." Memorias del IX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A. C. Gómez Palacio, Dgo. 1: 44-45.
- Feber, M., E. W. Lamirande., A. Roberts., A. Rice., H. Koprowski., B. Dietzschold., M. J. Schnell. (2005). "A single immunization with a rhabdovirus-based vector expressing severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) S protein results in the production of high levels of SARS-CoV-neutralizing antibodies." Journal of General Virology 86: 1435-1440.
- Gaber, F. and S. Kapil (1999). "Development of an Antigen Spot Test for Detection of Coronavirus in Bovine Fecal Samples." Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 6: 542–544.
- Han, M. G., D. S. Cheon., X. Zhang., L. J. Saif. (2006). "Cross-Protection against a Human Enteric Coronavirus and a Virulent Bovine Enteric Coronavirus in Gnotobiotic Calves." Journal of virology 80: 12350–12356.
- Hasoksuz, M., K. Alekseev., A. Vlasova., X. Zhang., D. Spiro., R. Halpin., S. Wang., E. Ghedin., L. J. Saif. (2007). "Biologic, Antigenic, and Full-Length Genomic Characterization of a Bovine-Like Coronavirus Isolated from a Giraffe." Journal Of Virology 81(10): 4981–4990.
- Hasoksuz, M., A. E. Hoet., S. C. Loerch., T. E. Wittum., P. R. Nielsen., L. J. Saif. (2002). "Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in an Ohio feedlot." Journal Veterinary Diagnostic Investigate 14: 308–313.
- Hoet, A. E., P. R. Nielsen., M. Hasoksuz., C. Thomas., T. E. Wittum., L. J. Saif. (2003). "Detection of bovine torovirus and other enteric pathogens in feces from diarrhea cases in cattle." Journal Veterinary Diagnostic investigated 15: 205–212.
- Huang, C., K. Narayanan., N. Ito., C. J. Peters., S. Makino. (2006). "Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 3a Protein Is Released in Membranous Structures from 3a Protein-Expressing Cells and Infected Cells." Journal of virology 80: 210-217.

- Kapil, S., K. L. Richardson., C. Radi., C. Chard-bergstrom. (1996). "Factors affecting isolation and propagation of bovine coronavirus in human rectal tumor-18 cell line." Journal Veterinary Diagnostic investigated 8: 96-99.
- Lin, X., K. L. O'reilly., M. L. Burrell., J. Storz. (2001). "Infectivity-Neutralizing and Hemagglutinin-Inhibiting Antibody Responses to Respiratory Coronavirus Infections of Cattle in Pathogenesis of Shipping Fever Pneumonia." Clinical And Diagnostic laboratory Immunology 8: 357–362.
- Lin, X. Q., V. N. Chouljenko., K. G. Kousoulas., J. Storz. (2000). "Temperature-Sensitive Acetylerase Activity Of Haemagglutinin - Esterase Specified By Respiratory Bovine Coronaviruses." Journal medical microbiology 49: 1119 -1127.
- Liu, L., S. Hågglund., M. Hakhverdyan., S. Alenius., L. E. Larsen., S. Belák. (2006). "Molecular Epidemiology of Bovine Coronavirus on the Basis of Comparative Analyses of the S Gene." Journal Of Clinical Microbiology 44: 957–960.
- Majhdi, F., H. C. Minocha., S. Kapil. (1997). "Isolation and Characterization of a Coronavirus from Elk Calves with Diarrhea." Journal Of Clinical Microbiology 35: 2937–2942.
- Milane, G., A. B. Kourtesis., A. S. Dea. (1997). "Characterization of Monoclonal Antibodies to the Hemagglutinin-Esterase Glycoprotein of a Bovine Coronavirus Associated with Winter Dysentery and Cross-Reactivity to Field Isolates." Journal of Clinical Microbiology 35: 33-40.
- Ozdarendeli, A., R. S. Sylvie., G. D. Williams., S. D. Senanayake., D. A. Brian. (2001). "Downstream Sequences Influence the Choice between a Naturally Occurring Noncanonical and Closely Positioned Upstream Canonical Heptameric Fusion Motif during Bovine Coronavirus Subgenomic mRNA Synthesis." Journal of virology 75: 7362–7374.
- Park, S., C. Jeong., S. S. Yoon., H. E. Choy., L. J. Saif., S. H. Park., Y. J. Kim., J. H. Jeong. (2006). "Detection and Characterization of Bovine Coronaviruses

- in Fecal Specimens of Adult Cattle with Diarrhea during the Warmer Seasons." Journal Of Clinical Microbiology 44: 3178–3188.
- Schoenthaler, S. L. and S. Kapil (1999). "Development and Applications of a Bovine Coronavirus Antigen Detection Enzyme-Linked Immunosorbent Assay." Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 6: 30-32.
- Siddell, S., H. Wege., V. T. Meulen. (1983). "The Biology of Coronaviruses." Journal genetic Virol 64: 761-776.
- Tahir, R. A., K. A. Pomeroy., S. M. Goyal. (1995). "Evaluation of shell vial cell culture technique for the detection of bovine coronavirus." Journal Veterinary Diagnostic investigated 7: 301 -304.
- Thorns, C. J., M. M. Bell., D. Chasey., J. Chesham., P. L. Roeder. (1992). "Development of monoclonal antibody ELISA for simultaneous detection of bovine coronavirus, rotavirus serogroup A, and Escherichia coli K99 antigen in feces of calves." Am J Vet Res. 1: 36-43.
- Tusell, S. M., A. Schittone., K. V. Holmes. (2007). "Mutational Analysis of Aminopeptidase N, a Receptor for Several Group 1 Coronaviruses, Identifies Key Determinants of Viral Host Range." Journal Of Virology 81(3): 1261–1273.
- Vijaykrishna, D., G. J. D. Smith., J. X. Zhang., J. S. M. Peiris., H. Chen., Y. Guan. (2007). "Evolutionary Insights into the Ecology of Coronaviruses." Journal of virology 81: 4012-4020.
- Vijgen, L., E. Keyaerts., P. Lemey., P. Maes., K. Van Reeth., H. Nauwynck., M. Pensaert., M. Van Ranst. (2006). "Evolutionary History of the Closely Related Group 2 Coronaviruses: Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus, Bovine Coronavirus, and Human Coronavirus OC43." Journal of Virology 80: 7270–7274.
- Weiss, S. R. and M. S. Navas (2005). "Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus." Microbiology and Molecular Biology Reviews 69: 635–664.

- Wünschmann, A., R. Frank., K. Pomeroy., S. Kapil. (2002). "Enteric coronavirus infection in a juvenile dromedary (*Camelus dromedarius*)."
Journal Veterinary Diagnostic investigated 14: 441–444.
- Ye, Y., K. Hauns., J. O. Languard., B. L. Jacobs., B. G. Hougue. (2007). "Mouse Hepatitis Coronavirus A59 Nucleocapsid Protein Is a Type I Interferon Antagonist."
Journal of Virology 81(6): 2554–2563.
- Yoo, D. and D. Deregt (2001). "A Single Amino Acid Change within Antigenic Domain II of the Spike Protein of Bovine Coronavirus Confers Resistance to Virus Neutralization."
Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 8: 297-302.
- Zhang, Z., G. A. Andrews., C. Chard-bergstrom., H. C. Minocha., S. Kapil. (1997). "Application of Immunohistochemistry and In Situ Hybridization for Detection of Bovine Coronavirus in Paraffin-Embedded, Formalin-Fixed Intestines."
Journal of Clinical Microbiology 35: 2964–2965.