

RELEVAMIENTO POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN SEMEN CONGELADO DE ENFERMEDADES QUE AFECTAN LA REPRODUCCIÓN EN BOVINOS EN URUGUAY

Alzugaray MF¹, Suzuki K², Acevedo C¹, Satragno D¹, González G¹, Guarino H¹, Bermúdez J¹, Echeverría MG³

¹UDELAR, Departamento de Ciencias Microbiológicas – Instituto de Patobiología – Facultad de Veterinaria, Lasplaces 1550 C.P. 11600, Montevideo, Uruguay.

²Experto JICA PROVETSUR, Universidad de la Plata- Facultad de Ciencias Veterinarias

³Universidad Nacional de La Plata e Investigador del CONICET
Cátedra de Virología- Facultad de Ciencias Veterinarias.

Resumen: Las enfermedades reproductivas son una de las principales causas de los bajos índices de procreo en Uruguay. El diagnóstico de estas enfermedades se lleva a cabo por diversas técnicas de laboratorio; la mayoría de las cuales no permiten la diferenciación de las distintas subespecies de cada microorganismo, hecho que si se puede determinar por medio de la técnica de PCR. En este estudio se intentó determinar la presencia de genomas de: *Diarrea Viral Bovina*, *Herpesvirus bovino tipos 1 y 5*, *Campylobacter fetus fetus* y *fetus venereal* y *Tritrichomonas foetus foetus*. Para ello, 100 pajuelas de semen de bovinos de distintas razas fueron procesadas mediante PCR utilizando "primers" específicos para cada una de las enfermedades en estudio. Todas las muestras analizadas resultaron negativas a la detección de genomas de los agentes mencionados. Esta investigación permitió comprobar el buen nivel de los centros de reproducción evaluados, repercutiendo favorablemente en la sanidad del rodeo nacional. Así mismo, el chequeo de pajuelas de semen por medio de la técnica de PCR demostró ser una herramienta necesaria que debería ser utilizada de rutina ya que permite un rápido y eficiente diagnóstico.

Palabras Clave: bovino – diagnóstico - técnicas moleculares.

SURVEY OF DISEASES AFFECTING REPRODUCTION IN FREEZE BOVINE SEMEN USING THE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

ABSTRACT: Reproductive diseases are a major cause of low calving rates nationwide. The diagnosis of these diseases is performed by various laboratory techniques, most of them do not allow differentiation in different subspecies of each organism, a fact that it can be determined by PCR. This study attempted to determine the presence of genome of bovine viral diarrhea, bovine herpesvirus types 1 and 5, *Campylobacter fetus fetus* and *fetus venereal* and *Tritrichomonas foetus foetus*. One hundred bovine semen straws were collected and PCR technique using specific primers for each of the diseases studied were applied. All samples were negative for the detection of genomes of the pathogens mentioned. This investigation allowed to check the proper level of insemination centers evaluated, impacting positively on the health of the national herd. Likewise, the screening of bovine semen straws by PCR proved to be a necessary tool that would be used routinely for quick and efficient diagnosis.

Key Words: bovine – diagnostics - molecular techniques.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas a encarar en el control de las afecciones reproductivas del ganado bovino lo constituyen las enfermedades infecciosas transmitidas por el semen. Dentro de estas se incluyen varios agentes etiológicos destacándose virus, bacterias y protozoarios. Entre las enfermedades virales de mayor prevalencia en el Uruguay se encuentran el virus de Diarrea viral bovina (DVB) y el Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1) (1, 2, 3). La DVB ocasiona aborto, reabsorción embrionaria, repetición de celo o infertilidad en hembras, terneros con defectos teratogénicos y machos persistentemente infectados (PI). Su agente etiológico pertenece a la familia *Flaviviridae*, y presenta desde el punto de vista de su comportamiento *in vitro*, cepas citopáticas como no citopáticas (4). El BoHV-1 infecta tanto el tracto respiratorio como el genital, causando diversos trastornos reproductivos. En terneros jóvenes puede causar encefalitis, aunque el agente causal de esta enfermedad está clasificado actualmente como Herpesvirus bovino 5 (BoHV-5) (5). Dentro de las principales enfermedades bacterianas, se encuentra la Campylobacteriosis genital bovina, que se caracteriza por ocasionar infertilidad, repetición de celo y abortos. El agente etiológico es *Campylobacter fetus* con 2 subespecies: *venerealis* y *fetus* (6). La Tricomoniasis genital bovina produce repetición de celo, infertilidad, piómetra y aborto ocasional. Su agente causal es un protozoario flagelado llamado *Tritrichomona foetus* (7). La prevalencia de Campylobacteriosis en toros en Uruguay, determinada por Inmunofluorescencia de raspajes prepuciales, es del orden del 28%, mientras que la Tricomoniasis genital en estas últimas décadas no ha sido detectada (5). Si bien estas enfermedades son de transmisión venérea, y aunque la proporción de establecimientos que utilizan la inseminación artificial es baja, su uso constituye un medio muy importante para su difusión. Las limitaciones del aislamiento de estos agentes infecciosos a partir del semen pueden ser superadas con el empleo de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que ha demostrado ser altamente sensible y específica en el estudio de genomas de diversos microorganismos (8, 9, 10). El objetivo de este estudio fue evaluar la condición sanitaria del semen bovino congelado de origen uruguayo que se comercializa en nuestro país por medio de la técnica de PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS Y SEPARACIÓN DE FRACCIONES SEMINALES:

Se analizaron 100 pajuelas de semen de distintas partidas, pertenecientes a 35 toros na-

cionales de razas predominantes a nivel nacional (63 Holando, 22 Hereford, 9 Aberdeen Angus, 3 Limousin y 3 Brangus) de distintos centros de reproducción del país, concentrados en 5 establecimientos que congelan semen. El fluido seminal se separó en tres partes mediante centrifugación (7000 g 10 min): 500 µl de plasma para la obtención de ARN, 500 µl de plasma para la obtención de ADN y el pellet celular para extracción de ADN de células totales.

EXTRACCIÓN DE ARN PARA DVB:

El ARN total fue obtenido mediante el reactivo de TRIzol® (Invitrogen). Para ello, 500 µl de plasma seminal se mezclaron y agitaron durante 10 min con 500 µl de TRIzol® y 220 µl de cloroformo. Posteriormente a ser centrifugado a 12000 g por 10 min, la fase acuosa superior (650 µl) fue precipitada con 750 µl de isopropanol a -20° C, se centrifugó a 12000 g por 10 min, se secó a 37 °C por 10 min y se resuspendió con agua libre de nucleasas (40 µl).

TRANSCRIPCIÓN REVERSA:

Para el primer paso de síntesis de ADN copia se incubaron 5 min a 70°C, 5 µl de ARN, 1 µl de Random Primers® (Biodynamics) y 9 µl de agua libre de nucleasas. Luego se realizó la segunda etapa, agregándose a la mezcla anterior 5 µl Buffer MMLV (Promega), 1 µl de dNTPs, 1 µl RNasin (Promega), 1 µl MMLV transcriptasa reversa (Promega) y 2 µl de agua libre de nucleasas (total 25 µl), incubándose a 37 °C una hora para permitir la síntesis del ADN copia.

EXTRACCIÓN DE ADN:

Se realizó la extracción de ADN de plasma seminal para BoHV siguiendo el protocolo de extracción destinado a sangre entera de Wizard® Genomic DNA Purification Kit, mientras que para *Campylobacter fetus* y *Tritrichomona foetus foetus* se utilizó el pellet seminal siguiendo el protocolo para bacterias Gram negativas del kit anteriormente citado.

PRIMERS:

Para DVB las secuencias fueron: 324F 5'ATGCCCTTAGTAGGACTAGCA3' y 326R 5'TCAACTCCATGTGCCATGTAC 3' (GenBank FM 161986) produciendo un producto de PCR de 252 pb. Para el caso de BoHV se utilizaron dos pares de cebadores que amplifican una porción genómica de 183 pb del gen TK de BoHV-1 y de 564 pb del gen de la gD del BoHV-5 [11]. Se utilizaron cebadores específicos para *Campylobacter fetus fetus* (producto de 960 pb) y *Campylobacter fetus venerealis* (producto de 142 pb) de acuerdo con Hum y col. (9). Para el caso de *Tritrichomona*

foetus foetus las secuencias utilizadas fueron las utilizadas por Felleisen y col. (10) dando un producto de 347 pb.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR):

Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl de los cuales la mitad consistió en 2xPCR Master Mix (Promega) y 1 µl de cada molde, ADN o ARN. De acuerdo a la concentración de los primers utilizada, se varió el volumen de agua libre de nucleasas. Para DVB se adicionaron 0,125 µl de cada primer y las condiciones de ciclado consistieron en 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg y 72 °C por 1 min. Para el caso de BoHV-1 la mezcla de reacción contuvo 0,25 µl de cada primer, mientras que para BoHV-5 se utilizó 1 µl de cada primer. Las condiciones de ciclado fueron 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 56 °C por 1 min y 72 °C por 1 min. Para *Campylobacter fetus fetus* se utilizaron 0,25 µl de cada primer y para *Campylobacter fetus venerealis* 0,125 µl. El ciclado fue común a ambas subespecies de 35 ciclos de 95 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg y 72 °C por 2 min. Para *Tritrichomona foetus foetus* se utilizaron 0,125 µl de cada primer y las condiciones de ciclado fueron 35 ciclos de 95 °C por 30 seg, 60 °C por 30 seg y

72 °C por 1 min. En todos los casos, se realizó un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C 10 min y un ciclo final de extensión a 72 °C 5 min en un termociclador Corbett Research, Modelo Palm-Cycler®. Los productos de amplificación (8 µl) fueron sembrados en geles de agarosa con buffer TBE 0,5 x (0,045 M Tris-borato y 0,001M EDTA [pH 8]), al 1,5, 2 o 2,5 % de acuerdo al tamaño de producto esperado y fueron visualizados en transiluminador con luz ultravioleta después de ser teñidos por 10 minutos en 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Para validar cada una de las PCR, se utilizaron cepas controles.

RESULTADOS

Todas las muestras recibidas y analizadas resultaron negativas para la detección de los agentes estudiados. En todos los casos se obtuvieron resultados positivos con las cepas controles, lo cual valida las técnicas realizadas (Figura 1).

DISCUSIÓN

Los diagnósticos realizados no arrojaron resultados positivos para los agentes estudiados. Sin embargo, estudios llevados a cabo en Uruguay por Guarino y col. (12) detectaron sobre un total de 204 muestras de semen congelado, 4

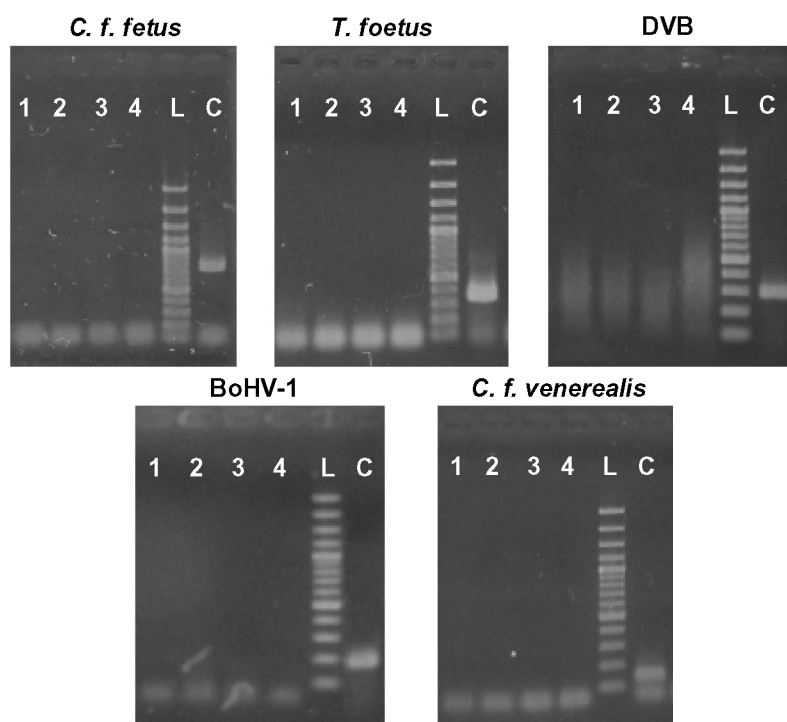


Figura 1: Amplificación por PCR para *C. f. fetus*, *T. foetus*, DVB, BoHV-1 y *C. f. venerealis*. Filas 1 a 4: muestras de semen (todas negativas); L: Marcador de 100 pb; Filas C: control positivo para cada uno de los agentes mencionados (aproximadamente 960, 347, 252, 183 y 142 pb respectivamente)

Figure 1: PCR amplification of *C. f. fetus*, *T. foetus*, DVB, BoHV-1 y *C. f. Venerealis* genomes. Files 1-4: negative semen samples; L: 100 bp ladder; File C: positive control of each pathogen (960, 347, 252, 183 and 142 bp respectively)

muestras positivas a DVB (1,9 %), 11 a BoHV-1 (5,3 %) y 11 a *Campylobacter fetus fetus* (5,3 %). Como hemos mencionado anteriormente, la presencia de BoHV constituye un riesgo ya que el animal portador de virus latente puede excretar el mismo luego de un periodo de inmunosupresión. Consideramos que este hecho fue subsanado al obtener varias muestras del mismo animal con intervalos de tiempo cortos. Por medio de la técnica de PCR es posible evaluar diferentes partidas de semen y así asegurar el uso de aquellas libre de virus detectando al portador. En el caso de DVB, se puede detectar el virus en animales PI, no identificables serológicamente. Con esta técnica se logra la detección en forma sencilla y prematura del virus. Para el caso de *Campylobacter* y *Tritrichomonas*, la mayor ventaja de la PCR es que detecta al agente en partidas de semen congeladas donde no se dispone del toro para realizar raspajes prepuciales. Es importante destacar que en el caso de nuestro estudio los centros que colaboraron son de reconocida trayectoria nacional y demostraron eficiencia al momento de enviar las muestras en condiciones adecuadas, así como en el trabajo diario con los animales. Asimismo, las razas procesadas son de importancia ya que se trata de las razas más representativas en nuestro país, permitiendo evaluar la calidad de semen que es comercializada tanto a establecimientos de leche como de carne, a pesar que solo 6 % de los establecimientos uruguayos utilizan inseminación artificial (5).

Se logró demostrar que el análisis de semen por la técnica de PCR es rápido y sensible, permitiendo certificar la condición de libre de los principales agentes infecciosos, y de esta manera se puede controlar la diseminación de los mismos en el rodeo. El uso de semen sin chequeo previo trae aparejado un importante riesgo de fracaso en el intento de mejoramiento genético uruguayo.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio contó con el apoyo económico de JICA (Agencia Internacional de Cooperación del Japón). Un especial agradecimiento a Dr. Alejandro Valera por la lectura crítica del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mederos A, Hirigoyen D. Relevamiento epidemiológico de Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueítis Infecciosa Bovina y Leucosis bovina en predios lecheros del noreste de Uruguay. XXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, 1998; 18- 29 junio, pág. 19-20.
2. Saizar J. Estudio serológico de la Diarrea Viral Bovina en bovinos del Uruguay. Veterinaria 1998; 34: 9-14.
3. Saizar J. Determinación de la prevalencia de la Rinotraqueítis Infecciosa bovina en rodeos de leche y carne en Uruguay. Veterinaria 1997; 33: 3-6.
4. Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ. Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea viruses infection of cattle. Ann Resh Vet 1987; 18: 157-166.
5. Repiso M, Gil A, Bañales P, D´Anatro N, Fernández L, Guarino H, Herrera B, Núñez A, Silva M, Olivera M, Osawa T, Silva M. Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. INIA 2001; 13: 1- 43.
6. Berg RL, Jutila JW, Firehammer BD. A revised classification of *Vibrio fetus*. Am J Vet Res (1971). 32: 11-22.
7. Anderson M. Diagnóstico de causas infecciosas en aborto bovino. XXXII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú 2004; 10-12 junio, pág. 159-163.
8. Rocha M, Barboza E, Guimaraes S, Dias Neto E, Gouveia A. A high sensitivity Nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. Vet Microbiol 1998; 63:1-11.
9. Hum S, Quinn K, Brunner J, On SL. Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus subspecies*. Aust Vet J 1997; 75: 827- 831.
10. Felleisen RS, Lambelet N, Bachmann P, Nicolet J, Muller N, Gottstein B. Detection of *Tritrichomonas fetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. J. Clin Microbiol 1998; 36: 513-519.
11. Alegre M, Nanni M, Fondevila N. Development of a Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Differentiation of Bovine Herpesvirus-1 and 5. J Vet Med B 2001; 48: 613- 621.
12. Guarino H, D´Anatro N, Bañales P, Fernández L, González G, Bailón M. Control de la calidad sanitaria y biológica del semen bovino congelado. XXXII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú 2004; 10-12 junio, pág. 214- 216.