



CONTROL DE LA CALIDAD SANITARIA Y BIOLÓGICA DEL SEMEN BOVINO CONGELADO*

Guarino, H. ^{1,2}, D'Anatro, N. ², Bañales, P. ²,
Fernández, L. ², González, G., ¹ Bailón, M. ¹.

¹FACULTAD DE VETERINARIA

²DILAVE «MIGUEL C. RUBINO» .

* Proyecto INIA/BID LIA 013

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la condición higiénico sanitaria y de fertilidad potencial del semen bovino congelado que se comercializa en nuestro país, así como la condición serológica de los toros dadores frente a los virus de HVB-1 y DVB. Para ello se investigó la presencia de agentes como *Campylobacter*, *Tritrichomonas foetus*, HVB-1 y DVB por PCR y técnicas convencionales, evaluándose las partidas por su calidad biológica. Se relevaron 204 partidas de semen de 19 centros de toros y establecimientos que congelan semen. Se observó una alta prevalencia de animales seropositivos a ambas infecciones (>50%), detectándose, por PCR el virus de HVB-1 en 11 partidas, el de DVB en 4, y *Campylobacter* en 11 partidas de semen. En cuanto a la calidad biológica del semen, en las muestras analizadas para el presente trabajo se observa un 25 % de rechazo entre muestras no aptas y cuestionables. El análisis del semen congelado por PCR es una herramienta que permite certificar la condición de libre de los principales agentes infecciosos, controlando así la diseminación de los mismos en el rodeo.

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the sanitary condition and the potential fertility of the frozen semen in Uruguay, as well as the serological condition to HVB-1 and BVD of the donors bulls. The most important agents transmitted by semen were investigated: *Campylobacter*, *Tritrichomonas foetus*, HVB-1 and BVD. Two hundred and four semen batches were analyzed from 19 artificial insemination Centers and farms. High seroprevalence was observed to both viral infections (up to 50%), and genome detection was: 11 for HVB-1, 4 for BVD, and 11 for *Campylobacter*. Semen quality was evaluated, and 25% of semen was observed within unsatisfactory and questionable batches. PCR demonstrated to be a good tool to certify the semen sanitary condition to the most prevalent agents, in order to control its dissemination in the herd.

INTRODUCCION

Las enfermedades infecciosas transmitidas por el semen constituyen uno de los principales problemas a encarar en el control de las afecciones reproductivas del ganado bovino. Estas incluyen variados agentes etiológicos entre los que se destacan bacterias, virus y protozoos. Dentro de las enfermedades virales, de alta prevalencia en el país (5,7,8,9) se encuentran el HVB-1 (IBR) y el virus de Diarrea Viral Bovina (DVB). El Herpesvirus bovino tipo 1 (HVB-1) infecta tanto el tracto respiratorio como genital causando diversos trastornos reproductivos (5). El virus de la DVB pertenece a la familia *Flaviviridae*, con cepas citopáticas y no citopáticas. En el

tracto reproductor causa abortos, infertilidad, repetición de celos, reabsorción embrionaria y terneros con defectos teratogénicos, y persistentemente infectados (PI), influyendo en la calidad del semen y disminución de la tasa de concepción (4,6). Entre las principales enfermedades bacterianas, se encuentra la *Campylobacteriosis* genital bovina, causada por el *Campylobacter fetus* subesp. *venerealis*, caracterizada por infertilidad, mortalidad embrionaria y aborto. La Trichomoniasis Genital Bovina causada por el *Tritrichomonas foetus*, protozoo flagelado, produce infertilidad y aborto. Siendo ambas enfermedades de transmisión venérea, la inseminación artificial constituye un medio importante de transmisión. Muchas de las limitantes del aislamiento de agentes infecciosos a partir del semen pueden ser superadas con el empleo de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) demostrando ser altamente sensible y específica en el estudio de genomas de diversos microorganismos (10,12). La calidad biológica depende del número de espermatozoides con movimiento rectilíneo, del porcentaje de esos espermatozoides en la dosis y de su morfología. En lo que respecta a la evaluación de semen congelado se determinan parámetros cuantitativos (volumen y concentración) y cualitativos (porcentaje de espermatozoides vivos y vigor por un lado y porcentaje de espermatozoides con anomalías por el otro). En la sección reproducción de la DILAVE se exige un mínimo de 6 millones de espermatozoides viables morfológicamente normales por dosis, 35 % de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme y menos de 30 % de anomalías totales con no más de 15 % de anomalías mayores (1,2,3). El objetivo de este trabajo fue relevar la calidad higiénico-sanitaria y potencial fertilidad del semen bovino nacional congelado comercializado en el país.

MATERIALES Y METODOS

Animales: Se analizaron 204 toros, tanto para carne como para leche ubicados en diferentes Centros de Toros del país. En total se muestrearon 19 Centros de Inseminación Artificial (IA) y establecimientos que congelan semen. Los animales dadores fueron identificados, siendo sangrados en el momento de la extracción de semen, recabándose la información en una planilla confeccionada a tal fin.

Estudios serológicos: El diagnóstico serológico de la infección por los virus de DVB y HVB-1 se realizó mediante la técnica de ELISA por competición e indirecto respectivamente, procesándose un total de 189 sueros para cada enfermedad. Se utilizaron kits comerciales (Lab. Pourquier, Francia) en microplaca de 96 pocillos, siguiendo el protocolo del fabricante.

Calidad biológica del semen: Se analizaron 186 partidas de semen de acuerdo a los parámetros cuali y cuantitativos usados en DILAVE.

1. Parámetros cuantitativos Se realizó el estudio de la concentración mediante un software denominado PERL, donde se ingresan los datos de volumen de la alícuota, volumen del diluyente y porcentaje de espermatozoides viables a la descongelación. La dilución es homogeneizada y montada en la cámara, iniciándose el conteo a los 5'. El número de espermatozoides por cuadrado es ingresado al programa PERL, habiendo un có-

digo para espermatozoides normales y otro para anormales. El programa brinda la concentración de en la dosis útil, el total de espermatozoides viables por dosis y el porcentaje de espermatozoides morfológicamente anómalos.

2. Parámetros cualitativos Se utilizó un baño maría a 37°C, dejando las pajuelas medianas durante 40 segundos y las pajuelas finas 30 segundos. Una vez descongelado se vacía el contenido en un tubo de vidrio precalentado, se homogeniza, se colocan de 10 a 15 ul en un portaobjeto sobre platina térmica y cubriéndolo con un cubreobjetos. Se observa en microscopio de contraste de fases. Para el Test de termoresistencia (TTR) se utilizó un baño seco a 35°C, evaluándolos nuevamente a las 2 horas. El estudio de la morfología se realizó con semen diluido en formol bufferado o citratado, con microscopio de contraste diferencial de interferencia, permitiendo el estudio completo de la morfología espermática.

Inmunofluorescencia Directa: Para la detección de *Campylobacter fetus sp* las muestras fueron centrifugadas a 1.200 rpm y el sobrenadante fue centrifugado nuevamente resuspendiendo el pellet en 200 µl de suero fisiológico. De esa suspensión se utilizaron 10 µl para la preparación del frotis fijado 30 m. en acetona a 4° C. Se incubó con el suero conjugado (Dilave) a 37° C durante 30 minutos observándose con microscopio de luz ultravioleta (Olympus BX60). Se procesaron 122 partidas de semen por esta técnica.

Extracción de Ácidos Nucleicos: Para la extracción del ADN del virus HVB-1 y del *Campylobacter* se utilizó un kit comercial (QIAamp®, USA) basado en columnas de sílica-gel. Brevemente el semen fue centrifugado a 1500 rpm, durante 30'. El sobrenadante (140 µl) fue mezclado con buffer de lisis y proteasa, y luego de una incubación por 10 min. la muestra fue precipitada con etanol, colocada en la columna y centrifugada a 6.000 xg por 1min. Finalmente el ADN purificado fue eluido de la columna con 50 µl de agua destilada estéril. Los ácidos nucleicos extraídos fueron guardados a -20° C hasta su amplificación. Para la extracción del virus de DVB, de genoma ARN, se utilizó una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina (TriPure™ Boehringer Mannheim), por separación de fases. A la muestra homogeneizada con solución de lisis, se le adicionó cloroformo ppa. procediéndose a la centrifugación. La muestra queda separada en 3 fases. La fase superior incolora se pasó a un tubo, obteniéndose el ARN luego de una precipitación alcohólica.

Amplificación en cadena de la polimerasa (PCR): Para la amplificación del ADN viral se siguió el protocolo de Rocha y col, 1998, utilizando primers de la secuencia de la glicoproteína gl. La reacción de PCR consistió en una mezcla de 10mM Tris-HCl buffer pH 8.3, 50 mM KCl, 200mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1U Taq DNA polimerasa, 0.5µM de cada primer en un volumen de 20 µl y 5µl del ADN extraído. Los ciclos consistieron en: 94 °C, 6', 35 ciclos, de 60s a 95° C, 60s a 56° C y 60s a 72° C, y extensión final de 5 min a 72° C. Para el virus de DVB, la transcripción reversa del ARN y la posterior amplificación fue realizada en un único tubo utilizando la enzima rTth DNA polimerasa (Perkin Elmer, USA).

Para el análisis de *Campylobacter fetus* se siguió el protocolo desarrollado por Hum y col (11). La mezcla fue sometida a 30 ciclos de 95° C 20", 50° C 20", 72° C 2' y una extensión final de 72° C durante 10'. Los productos de PCR fueron analizados por corrida electroforética a 110V, 30min. en geles de agarosa al 1.5% en TAE buffer

(0.04M Tris-acetato, pH 8.5 con 0.002M EDTA) . Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta.

RESULTADOS

ESTUDIOS SEROLÓGICOS

Del total de sueros analizados (n = 189), 118 (62.4 %) fueron positivos a anticuerpos anti - HVB-1 y 113 (59.8 %) a anticuerpos anti-DVB, mientras que 42 lo fueron a ambas infecciones (Graf. 1)

CALIDAD BIOLÓGICA DEL SEMEN

Con respecto a la categorización en relación a la calidad del semen, se observó que de las 186 partidas analizadas, 142 (76.3%) fueron consideradas Aptas, 18 (10%), Cuestionable y 28 (15%) No Aptas. (Graf.2).

DETECCIÓN DE AGENTES INFECCIOSOS

Analizadas las partidas de semen por PCR en todos los casos se observaron bandas del tamaño esperado de acuerdo a los primers utilizados.

RELACIÓN IFD/PCR CAMPYLOBACTER:

A la inmunofluorescencia para *Campylobacter* 11 muestras resultaron positivas, de las cuales 10 fueron coincidentes con la detección por PCR (91%), siendo una de ellas negativa a PCR y una muestra que fue positiva a PCR no lo fue por IFD.

Grafico 1: Distribución de los animales en función de su condición serológica a IBR y DVB.

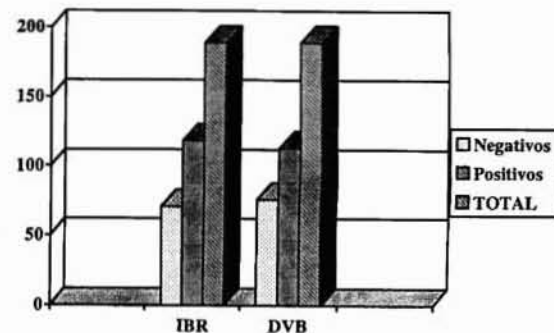
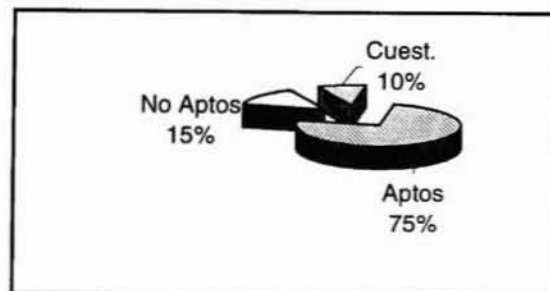


Grafico 2. Distribución de las partidas de semen por su clasificación de aceptabilidad.





Cuadro 1. Causas de no aceptabilidad de las partidas de semen según el motivo de rechazo.

Motivo	Cuestionable (n=18)	No Apto (n=28)
Baja Motilidad	8	4
Def. Morfológicas	8	14
Células Inflamatorias	1	3
Baja Mot / Def Morf.	1	5
Baja Mot / Baja Concentración	-	2

Cuadro 2: Resultados obtenidos por la técnica de PCR para *Campylobacter*, IBR y DVB.

	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
<i>Campylobacter</i>	11	193	204
DVB	4 (*)	200	204
IBR	11	193	204

(*) De los 4 animales positivos a PCR para DVB se contó con la sangre de tres de ellos que resultaron seronegativos a la prueba de ELISA.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se observó una alta prevalencia de toros seropositivos a HVB:1 en todos los establecimientos y centro estudiados, lo que constituye un riesgo en la transmisión venérea de la enfermedad, ya que el animal portador puede excretar el virus en forma intermitente. Aunque lo ideal sería usar toros seronegativos, la alta prevalencia observada lo torna dificultoso, sobretodo en animales de alto valor genético. Por medio del uso de la técnica de PCR, es posible chequear las diferentes partidas de semen y así aseguramos el uso de aquellas que estén libres del virus. En el caso de DVB, se puede detectar el virus en toros P.I. diseminadores en forma continua del virus, al ser animales seronegativos y por lo tanto no identificables serológicamente, por lo que se logra con esta técnica la detección del virus en forma sencilla y rápida. Para el caso de *Campylobacteriosis* Genital Bovina, esta técnica, la mayor ventaja es que permite la detección del agente en aquellas partidas de semen congelado en las cuales no se dispone del toro para efectuar los raspados prepucciales. En conclusión se demos-

tró que el análisis de las partidas de semen por la técnica de PCR es sensible y rápido y permite certificar la condición de libre de los principales agentes infecciosos, controlando así la diseminación de los mismos en el rodeo. En cuanto a la calidad biológica del semen, en las muestras analizadas para el presente trabajo se observa un 25 % de rechazo entre muestras no aptas y cuestionables. El uso del semen sin chequear trae aparejado un importante riesgo de fracasar en el mejoramiento genético intentado.

BIBLIOGRAFIA

- Bañales P., Fernández L. Evaluación de Semen Congelado. Jornadas de patología reproductiva en bovinos. Colonia Suiza, 1997.
- Barth, A.D. y Oko, R.J. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Iowa State University Press Ames 1989.
- Goffaux, M. L'examen approfondi des anomalies morphologiques de la semence du taureau. UNCEIA - Journée Technique, Paris, avril 1991.
- Guarino H, 2000 Bovine Pestivirus in Uruguay. Tercer Encontro de Virología do Mercosul XI Encontro Nacional de Virología. San Lorenzo, MG 25-29 noviembre 2000. Abstracts
- Guarino H., 1997. Herpesvirus bovino-1: Algunas consideraciones y su situación en Uruguay. Jornadas de patología reproductiva en bovinos. Colonia Suiza. Abstr.
- Brownlie J, Clarke M.C, Howard C.J et al, 1987 Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. Ann Resh Vet. 18: 157-166
- Mederos A, Hirigoyen D. 1998 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 p 19-20.
- Saizar J. 1997 Determinación de la prevalencia de la Rinotraqueítis Infecciosa bovina IBR en rodeos de leche y carne en Uruguay. Veterinaria: 33.(133) 3-6.
- Saizar J. 1998 Estudio serológico de la Diarrea Viral Bovina en bovinos del Uruguay. Veterinaria. Vol 34 : 138 p 9-14.
- Rocha MA., Barboza E:F., Guimaraes S.E.F., Dias Neto E., Gouveia A.M. 1998 A high sensitivity Nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. Vet. Micr.63:1-11.
- Hum S., Quinn K Brunner J., On SLW. Evaluation of a PCR assay for identification y differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies Aust. Vet. J. 1997, 75:827-831.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning A Laboratory Manual. 2nd. Ed.