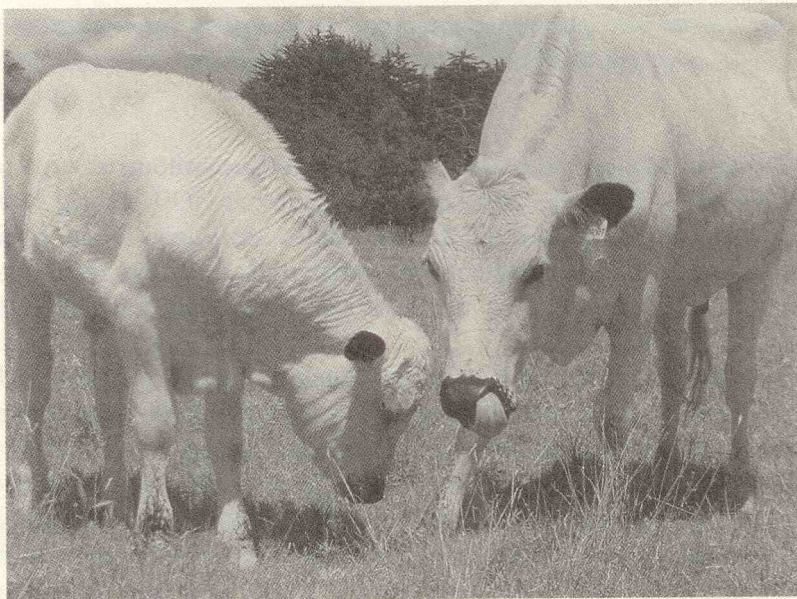
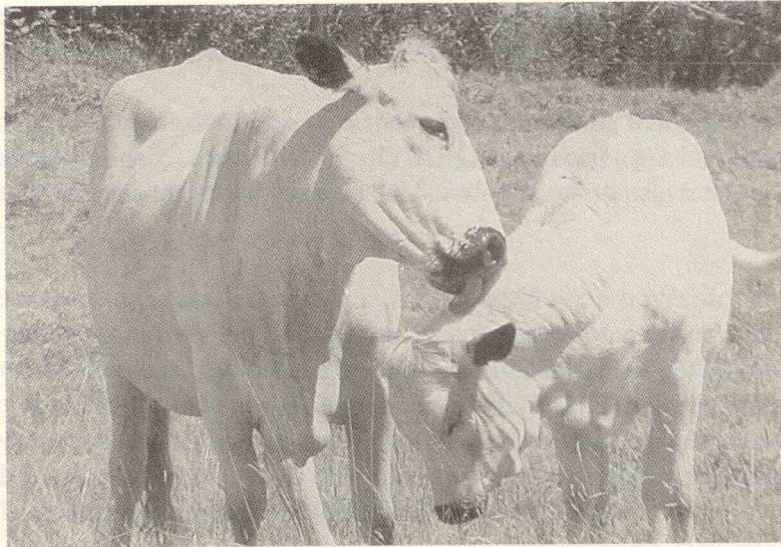


SECCIÓN III

Inmunidad e infección



Resistencia natural del ganado blanco orejinegro a brucelosis y fiebre aftosa*

John Jairo Arboleda C.

*Médico veterinario, MSc en Medicina tropical, investigador del Laboratorio de Virología, Depto. de Microbiología y Parasitología.
Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia*

Introducción

La resistencia natural a infecciones se refiere a la capacidad inherente de un animal para controlar la infección, evitar el desarrollo o la progresión del proceso cuando se expone a patógenos, sin haber tenido una exposición previa o inmunización. El mayor componente de esta resistencia es heredable y transmitido en forma estable de los padres a su descendencia (Templeton, Smith, Adams, 1988).

La historia de las investigaciones en resistencia natural a las enfermedades de los animales domésticos es relativamente corta. Se inicia en el decenio de los 40, con el descubrimiento del grupo de sangre B en las aves, que posteriormente en los 60 se confirmó como el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). En los años 70 se demostró un CMH para cerdos (SLA, *Swine Leucocyte Antigen*), ovejas (OLA), cabras (CLA), bovinos (BoLA), equinos (ELA) y en la actualidad se están describiendo los CMH en peces, tales como salmones y carpas, en el estudio de estrategias para el control de las enfermedades que afectan estos animales (Van der Zijpp & Egberts, 1989).

En aves se ha demostrado la asociación entre la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad de Marek --una entidad de etiología viral que afecta los linfocitos T de las

* Artículo publicado originalmente en: *Temas selectos de infectología. Memoria electrónica 1996.*

aves-- con diferentes grados de severidad dependiendo del Complejo B aviar (Van der Zijpp & Egberts, 1989).

El estudio de los mecanismos de resistencia innata ha sido difícil, puesto que son complejos desde el punto de vista inmunológico y poligénicos desde la perspectiva de su control genético.

Desde los años 50, Hutt consideraba que, en principio, es teóricamente posible introducir mejoras genéticas para controlar las enfermedades de los animales domésticos; estas hipótesis han sido ignoradas durante todos estos años. Sin embargo los avances recientes en biotecnología nos han proporcionado herramientas poderosas para dilucidar la genética molecular que regula los loci de resistencia (Templeton et al 1988, 1990; Vidal et al 1993).

Existen otros investigadores que han identificado algunos genes que están involucrados en la resistencia temprana a infecciones; es así como en el cromosoma 1 del ratón se descubrió un locus llamado Bcg/Lsh/Ity y más recientemente Nramp1, que controla los estados tempranos de resistencia a tres patógenos intracelulares no relacionados: varias especies de *Mycobacterium* (Bcg), *Leishmania donovani* (Lsh) y *Salmonella typhimurium* (Ity). Aunque la heredabilidad de la resistencia a cada uno de estos patógenos fue identificada separadamente, no hay recombinación entre los loci de resistencia para cada uno de los patógenos y se considera que los fenotipos de resistencia son los efectos de un sólo gen (Vidal, Gros, et al 1992).

El gen Bcg (Nramp1) está estrechamente relacionado con muchos otros genes, tales como Col3a1 (Collagen type IIIa1), Len2 (Gamma cristallin), Fn-1 (Fibronectin), Tp-1 (Transpositional protein), Lambda Mm1c-165 (Micro dissected gDNA probe), Vil (Villin), Inha (Inhibin A), Pax-3 (paired homeoic box gene number 3), Acrg (acetyl choline receptor gamma subunit), Sag (retinal S antigen), Col 6a3 (collagen type IVA3), y con Ren 1,2 (renin) (Schurr et al, 1990; Vidal et al 1992).

La distancia calculada entre el gen Bcg, el Vil y el Mm1c-165 lambda es de 0,4cM aproximadamente (Schurr et al, 1989). El mismo grupo de estos genes se conserva en el brazo corto del cromosoma 2 humano y en el grupo sinténico U17 del cromosoma 2 bovino; también se ha logrado mapear el gen Nramp en este cromosoma e igualmente se ha demostrado su expresión en macrófagos (Schurr, et al, 1990).

Aunque la proteína que codifica el gen Bcg (Nramp) no ha sido identificada, si se logró predecirla puesto que ya se sabe que el gen Bcg tiene 15 exones que codifican una proteína de 550 aminoácidos (Blackwell et al, 1995). El gen Nramp1 ha sido recientemente identificado como el gen candidato para el Bcg, el Nramp1 es expresa-

do exclusivamente en macrófagos como un transportador de proteínas integrado a la membrana, con diez dominios transmembranales y tiene homología estructural con otros sistemas de transporte celular en eucariotes y procariotes, además está involucrado en el transporte y producción de los metabolitos intermedios del nitrógeno.

El gen Bcg se expresa en los órganos del sistema monocito-macrófago y que la expresión del alelo dominante del Bcgr, aumenta la habilidad del macrófago para matar microorganismos intracelulares. El gen Bcg también incrementa la explosión respiratoria, así como la respuesta a interferón gamma y la densidad de los antígenos de expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase II, entre otras funciones; por lo tanto, este gen juega un papel importante en las estrategias del hospedero contra el establecimiento y la sobrevivencia de los patógenos intracelulares (Blackwell et al 1988, Denis et al 1988).

Resistencia natural a *Brucella abortus*

La brucelosis es una enfermedad zoonótica, causada por varias especies del género *Brucella*, de distribución mundial y se le considera uno de los mayores problemas sanitarios y económicos de la producción pecuaria. Afecta en particular a animales domésticos, tales como ovejas, cabras, bovinos y cerdos, produciendo abortos en hembras y orquitis en machos. La brucela es transmitida al hombre principalmente por consumo de leche y sus derivados no pasteurizados.

Estudios realizados en la Universidad de Texas A&M, Estados Unidos de América, han logrado caracterizar hatos naturalmente resistentes o susceptibles a brucelosis (Templeton et al, 1990). Además se logró demostrar que esta resistencia natural puede ser dramáticamente incrementada por una simple selección de los apareamientos, en una sólo generación, de tal manera que la frecuencia de resistencia natural a brucelosis en bovinos no vacunados fue del 18% y, apareando un toro resistente con vacas resistentes, ésta se incrementó a 53,6% en la progenie.

Para determinar esta resistencia natural, el ganado no vacunado, de ambos sexos (machos maduros o vacas en la mitad o al final de la gestación), fue retado con 10^7 UFC de *Brucella abortus* S2308 y se tomaron muestras para cultivo 3 a 5 meses después de la inoculación; las vacas resistentes no abortaron y no se cultivaron brucelas de ellas o de sus terneros, lo cual si sucedió con los animales controles susceptibles. De la misma manera, al sacrificio, los toros resistentes estaban libres de *B. abortus* (Templeton et al, 1989).

Aunque aún no se ha establecido la identidad del gen o genes que controla(n) la resistencia a *B. abortus*, los datos sugieren que un homólogo bovino del gen Bcg murino

puede estar involucrado. Además, existe una extraordinaria similitud entre la capacidad funcional de los macrófagos bovinos resistentes o susceptibles y la capacidad funcional de los macrófagos en el modelo murino. Dicho en otros términos, los macrófagos mamarios de vacas resistentes y los macrófagos derivados de monocitos de vacas y toros resistentes, son más activos y eficientes que los macrófagos de vacas y toros susceptibles, según se evalúa con pruebas de:

1. Explosión respiratoria en respuesta a *B. abortus* opsonizada.
2. Habilidad para controlar la replicación de *B. abortus*.
3. Habilidad para controlar la replicación de *Salmonella dublin*

También, mediante ensayos para medir la capacidad de eliminar brucelas de los macrófagos de bovinos no retados con *B. abortus*, se ha pronosticado resistencia o susceptibilidad con un 83% de precisión (Templeton and Adams, 1990).

Estas similitudes entre las funciones de los macrófagos bovinos y la resistencia a brucelosis, por un lado, y las funciones de los macrófagos murinos y la resistencia a *Salmonella*, *Mycobacterium* y *Leishmania*, por otra parte, permiten plantear que un homólogo bovino del gen Bcg murino es probablemente el gen más importante para la expresión de la resistencia a Brucelosis. Esta hipótesis está soportada además, por la sintenia en el grupo de ligamiento del gen Bcg en el cromosoma 1 del ratón y el cromosoma 2 del bovino.

Resistencia natural a fiebre aftosa

En términos generales, el resultado de la infección viral en un hospedero particular depende de las interacciones entre el virus y los hospederos que son afectados; es así como se ha visto que en la población la exposición a un mismo agente viral ocasiona un rango de eventos que varían desde la enfermedad fatal hasta una infección asintomática.

La fiebre aftosa (FA) es producida por un virus de la familia Picornaviridae, el cual causa una enfermedad severa en los ganados vacuno y porcino, principalmente. Es una de las enfermedades más importantes desde el punto de vista sanitario y económico; ocasiona restricciones comerciales para la carne y sus derivados desde países con la enfermedad a países que han logrado erradicarla. Se caracteriza por formación de aftas o vesículas en espacio interdental, boca, lengua, pezones y rumen y e (Lubroth & Brown, 1995).

Se han hecho muchas investigaciones para determinar la resistencia de los hospederos a diferentes entidades, usando modelos murinos y para ello se han utilizado una

buena cantidad de virus, entre los cuales tenemos virus de la estomatitis vesicular bovina, citomegalovirus, ectromelia, rabia, influenza y coriomeningitis linfocítica, entre otros, y, en términos generales, la resistencia genética a la infección viral está ligada a los genes que controlan la respuesta inmune del hospedero o asociada a la presencia de receptores celulares apropiados, o enzimas o células blanco. En animales, también se han detectado diferencias individuales en el ganado bovino usado para evaluar la potencia de vacunas contra la FA (Mims and White, 1984). La constitución genética es, pues, uno de los factores más importantes que influyen en el resultado de las infecciones virales.

En el año de 1938, J. Prat hizo algunas observaciones durante un brote de FA en Francia, encontrando que sólo una de las vacas permaneció en buenas condiciones a pesar de la exposición constante. Cuarenta años después, durante otro brote severo, el mismo hato fue afectado y tres animales permanecieron libres de la FA y otros tres apenas sufrieron lesiones leves. De estos seis animales, tres vacas eran nietas de la vaca resistente original y dos de las otras tres eran bisnietas. Esta anécdota proporciona una fuerte evidencia sobre las bases genéticas de la resistencia a enfermedades.

La naturaleza de los receptores celulares para el virus de la FA no está completamente definida, así como tampoco otros factores que influyen en la capacidad del ganado bovino para resistir esta infección viral. El virus utiliza el tripéptido RGD (arginina, glicina, aspártico) para adherirse a las superficies celulares, lo cual también ocurre con *B. abortus* y otros microorganismos, para luego inducir una respuesta inmune en el hospedero. La familia de las integrinas, de la cual hacen parte las RGD, son abundantemente expresadas en las células de Langerhans del epitelio lingual, pero también se ha visto que esta unión a receptores y el reconocimiento de los péptidos virales o bacterianos por las células T bovinas está influenciada, además, por el complejo mayor de histocompatibilidad de los bovinos (BoLA) clase II, razón por la cual se ha considerado a estos genes como un segundo candidato para el control de la resistencia natural a FA.

Todavía falta mucho por conocer acerca de la patogénesis de la FA, particularmente sobre los mecanismos de diseminación de la enfermedad a partir del sitio de replicación primario. Conocer estos mecanismos es de gran importancia ya que se podría determinar si la infección tiende a ser generalizada y afectar boca, pezuñas, pezones, corazón, etc., o si permanecerá sólo en el sitio primario. No se sabe aún cómo el virus logra llegar hasta estos tejidos, ni tampoco se dispone de un modelo *in vitro* para estudiar la resistencia/susceptibilidad a esta enfermedad, pues aunque los fibroblastos son fáciles de cultivar, se sabe que el virus requiere un proceso de adaptación antes de estar en capacidad de crecer en estas células y, por esta razón, no permite inferir lo que está sucediendo *in vivo*. Algunos investigadores creen que los macrófagos alveolares

transportan virus en replicación y que así el virus logra alcanzar sitios tan distantes de los tejidos originales de infección. Igualmente, se han detectado, por hibridación *in situ*, macrófagos alveolares de curies infectados con el serotipo Asia 1 del virus de la FA (Brown et al, 1991). También se demostró que los macrófagos humanos poseen receptores para el poliovirus y que aparentemente son capaces de permitir su replicación (Haller et al, 1979).

Con todo lo antes dicho, nuestro grupo investigativo propone que el virus de la FA es capaz de adherirse y replicarse en macrófagos o en fibroblastos cultivados *in vitro* y, como consecuencia de ello, la magnitud del efecto citopático, la adherencia viral y/o la intensidad de la replicación del virus en estas células, son una indicación de resistencia o susceptibilidad a la enfermedad.

En Colombia y en Cuba, gracias a programas de alta selección de los individuos, aún sobreviven algunos hatos numerosos de bovinos criollos, situación que los constituye en un invaluable recurso natural, único e irrepetible. Además se argumenta, por parte de campesinos y ganaderos desde hace mucho tiempo atrás, que estas razas criollas, y particularmente en Antioquia (Colombia) la raza blanco orejinegro (BON), es resistente a las infecciones por brucelosis y fiebre aftosa y que, cuando estos animales sufren la enfermedad, las manifestaciones clínicas son muy leves o inaparentes. Por ello, nos dimos a la tarea de tratar de demostrar fehacientemente el estado resistente de esta raza criolla.

Las primeras razas de ganado bovino que llegaron al hemisferio occidental lo hicieron en el segundo viaje de Colón, en el año de 1493; se establecieron en las Islas Canarias y luego en la Isla La Española, ahora República Dominicana y Haití; posteriormente pasaron a las islas caribeñas y, por fin, hacia 1520, se establecieron en Sudamérica.

En estos animales, establecidos como poblaciones aisladas, los procesos evolutivos -tales como la selección natural y la deriva genética- determinaron la arquitectura de su genoma. Después de 1650, por medio de apareamientos selectivos, los ganaderos desarrollaron hatos de animales puros especialmente adaptados a las condiciones extremas del trópico. Los descendientes de estos animales formaron lo que hoy conocemos como “razas criollas” (de Alba J., 1987)

Cerca del año 1800, habían sido reconocidas alrededor de 40 razas criollas en América. Los primeros contactos de estas razas con los bovinos europeos ocurrieron después de 1825; la raza cebú fue introducida en el trópico cerca a 1860. Desde entonces se han realizado programas intensivos de cruzamientos con las razas “foráneas”, hasta el punto de que en la actualidad se considera que las razas de ganado criollo están en vía de extinción.

En el presente existen trabajos de investigación en el ganado criollo colombiano, tendientes a la conservación y propagación de estas razas. Para terminar, cabe destacar que se encuentra en pleno desarrollo un proyecto cooperativo de investigación, entre las universidades de Texas A&M y la Universidad de Antioquia, conjuntamente con Corpoica, para hacer una caracterización genética molecular y poblacional del ganado criollo colombiano, en el cual sus objetivos son los de identificar y seleccionar por ensayos *in vitro* los animales resistentes o susceptibles a brucelosis y FA, posteriormente hacer pruebas de selección *in vivo*, utilizar la biotecnología animal para aumentar el número de estos animales resistentes y susceptibles y, finalmente, hacer una selección genética asistida por marcadores para tratar de identificar la posición y funcionalidad de estos genes, con el fin de, en un futuro no muy lejano, lograr manipularlos y controlar las enfermedades de los animales domésticos por medio de la genética, lo cual serviría de base para las investigaciones humanas en este mismo campo.

Bibliografía

- Blackwell JM, Toole S, King M, Roach T, Cooper A. Analysis of Lsh gene expression in congenic B10. L-Lsh^r mice. *Curr Top Microbiol Immunol*. 137: 301-309; 1988.
- Blackwell JM et al. *Mol Med*. 1: 1076, 1995.
- Brown C, Olander G, Meger R. A preliminary study of the pathogenesis of Foot and Mouth disease virus using *in situ* hybridization. *Vet Path*. 28: 216-223; 1991.
- de Alba J. Criollo cattle of Latin America, p. 112. En: Anonymous (ed). *FAO Animal Production and health. Paper 66. Animal Genetic Resources. Strategies for improved use and Conservation*. FAO, Rome, 1987.
- Denis M, Forget A, Pelletier M, Skamene E. Pleiotropic effects of the Bcg gene. III. Respiratory burst in congenic Bcg^r and Bcg^s macrophages. *Clin Exp Immunol*. 73: 370-375; 1988.
- Haller O, Arnheiter A, Gresser I, Lindenmann J. Genetically determined interferon-dependent resistance to influenza virus in mice. *J Exp Med*. 149: 601-612; 1979.
- Hutt F. *Genetic resistance to disease in domestic animals*. Comstock publishing associates, Ithaca, NY, 1958.
- Lubroth J, Brown F. Identification of native FMDV non-structural protein 2C as a serological indicator to differentiate infected from vaccinated livestock. *Res Vet Sci*. 59 (1): 70-78; 1995.
- Mims C, White O. *Viral pathogenesis and Immunology*. Blackwell, Oxford, 1984. p 123-167.
- Prat J. Foot and mouthdisease resistance in cattle. *Soc Sci Vet Lyon*. 54: 297-300; 1952.

- Schurr E, Skamene E, Forget A, Gros P. Linkage analysis of the Bcg geneon mouse chromosome 1. Identification of a tightly linked marker. *J Immunol.* 142: 4507-4513; 1989.
- Schurr E, Buschman E, Malo D, Gros P, Skamene E. Immunogenetics of mycobacterial infections: mouse-human homologies. *J Infect Dis.* 161: 634-639; 1990.
- Templeton J, R Smith, III, Adams G. Natural disease resistance in domestic animals. *J Am Vet Med Assoc.* 192: 1306-1315; 1988.
- Templeton J, Estes D, Price R, Smith R III, Adams G. Immunogenetics of natural resistance to bovine brucellosis. 4th World Cong. Genetics Applied to Livestock Production, 1990. p 396-399.
- Templeton J, Adams G. Natural resistance to bovine Brucellosis, p. 144-150. En: Adams G (Ed). *Advances in brucellosis research: an international symposium.* Texas A&M University Press, College station, Tx, 1990.
- Templeton J, Adams G. Natural resistance to bovine Brucellosis, p. 144-150. En: Adams G (Ed). *Advances in brucellosis research.* Texas A&M University Press, College station, Tx, 1990.
- van der Zijpp AJ, Egberts E. The major histocompatibility complex and diseases in farm animals. *Immunology Today* 10 (4): 109-111; 1989.
- Vidal S, Epstein D, Malo D, Weith A, Vekemans M, Gros P. Identification and mapping of six microdissected genomic DNA probes to the proximal region of mouse chromosome 1. *Genomics* 14: 32-37; 1992.
- Vidal S, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P. Natural reistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* 73: 469-485; 1993.

Resistencia natural, *in vitro*, a los virus de estomatitis vesicular y de rinotraqueitis infecciosa en ganado Blanco Orejinegro*

Albeiro López, Zoot, MV, MSc; Alexander D. Salazar, est. Med. Vet; Guillermo A. Restrepo MV; Fabio N. Zuluaga, MV, MS; Jorge E. Ossa, MV, MS, PhD.

Grupo de Inmunovirología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia

Resumen

Este informe da cuenta de los resultados de un proyecto encaminado a determinar la posible diversidad fenotípica de la resistencia/susceptibilidad, in vitro, de la raza de ganado criollo colombiano, Blanco Orejinegro (BON), a la infección por virus de estomatitis vesicular (EV) y de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB). Se probaron 47 muestras de fibroblastos primarios de igual número de animales, mediante titulación viral, y se determinó la Dosis Infecciosa Mínima 50% por ml ($DIM_{50\%}/ml$) por el método de Spearman karber. Luego se obtuvieron los Índices de Resistencia/Susceptibilidad (IRS) y se agruparon los cultivos primarios de fibroblastos en resistentes y susceptibles con los siguientes resultados: Para RIB los 47 cultivos primarios de fibroblastos de ganado BON resultaron susceptibles; para EV serotipo Indiana, 37 fueron susceptibles y 10 resistentes, y para EV serotipo New Jersey, se encontraron 41 susceptibles y 5 resistentes. Un polimorfismo fenotípico en resistencia/susceptibilidad, in vitro, del ganado BON, se había demostrado previamente para el virus de la fiebre aftosa.

Palabras clave: Cultivos primarios de fibroblastos, ganado criollo colombiano, índice de resistencia/susceptibilidad, replicación viral

* Artículo publicado originalmente en: Rev Col Cien Pec. Vol. 15: 1, pág. 100-106 / 2002.

Introducción

Algunos individuos tienen la capacidad de contrarrestar las infecciones, por medio de mecanismos llamados de resistencia natural. La resistencia natural frente a las enfermedades infecciosas ha sido observada en varias especies de animales y según Templeton y colaboradores (26), ésta se define como “la capacidad inherente de un individuo para contrarrestar la enfermedad, sin previa exposición o inmunización con un patógeno, donde el mayor componente es heredable y establemente transmitido de los padres a la progenie”. Además, se ha demostrado que los mecanismos por los cuales un individuo puede resistir la enfermedad en forma natural incluyen factores inmunes y no inmunes.

El concepto de resistencia natural a infecciones virales ha sido estudiado desde la primera mitad del siglo XX cuando Webster demostró el fenómeno en ratones infectados con el virus de la fiebre amarilla; este investigador observó que la resistencia a este agente viral tenía un patrón de herencia mendeliana y de esta manera abrió el campo de la resistencia natural que, en la actualidad, es tema de investigación en enfermedades infecciosas del hombre (resistencia natural al HIV por ejemplo), y los animales (resistencia natural al virus de la fiebre amarilla en ratón) (6).

En Colombia existen siete razas de ganado criollo, todas ellas en un estado vulnerable según los parámetros de clasificación de especies en vía de extinción de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (10), dentro de estas razas se encuentra el ganado Blanco Orejinegro (BON), el cual se originó a partir de los ganados introducidos por los conquistadores, desde hace alrededor de cinco siglos, y se adaptó a las condiciones medioambientales de la región cafetera andina, sin una selección técnica por parte de los ganaderos. Esta raza representa un recurso genético valioso, pues su desempeño productivo ha sido caracterizado por sus buenos rendimientos, la alta fertilidad, la rusticidad y la longevidad, a pesar de las condiciones de explotación en suelos pobres, pendientes y en medio de los parásitos y demás condiciones propias de los climas cálidos y húmedos del trópico colombiano (2).

En la actualidad existen 2.866 animales BON puros en el país (10), distribuidos en unos pocos núcleos conservados por algunas instituciones públicas y por algunos ganaderos que junto con los programas de recursos genéticos del gobierno, han evitado su extinción. A pesar de los esfuerzos realizados por algunas personas y entidades para promover la raza y dar a conocer sus bondades en la producción pecuaria, los ganaderos siguen prefiriendo la explotación de razas foráneas.

Uno de los mayores atributos que ha contribuido al mantenimiento de esta raza, es la marcada resistencia a los ectoparásitos, especialmente al nucho (2, 7, 9, 14, 22). Se ha

demostrado que los individuos de raza BON presentan una menor susceptibilidad a la infestación con la larva de *Dermatobia hominis* y la respuesta inflamatoria que induce contra la misma es significativamente menor, en comparación con la raza Costeño con Cuernos que exhibe reacciones inflamatorias más intensas (4, 5). Además, se ha confirmado la resistencia del BON al nuche, como un carácter hereditario transmitido en forma dominante y, correlativamente, se clasificó al BON como medianamente resistente, comparado con el ganado Cebú que es resistente y el ganado Holstein que presenta el rasgo de susceptibilidad (8).

Según relatos de ganaderos y campesinos se sugiere que esta raza es más resistente a la brucelosis y a la fiebre aftosa, en comparación con razas especializadas en producción de carne y leche; además, se relata que cuando estos animales sufren estas enfermedades, las manifestaciones clínicas son más leves (5).

Para colaborar con la caracterización de los recursos genéticos de Colombia y afianzar los conocimientos sobre su biodiversidad, nuestro grupo de investigación está desarrollando proyectos tendientes a verificar la resistencia natural del ganado criollo colombiano BON a varios agentes infecciosos entre ellos, *Salmonella Dublin SL2260* (modelo para estudiar resistencia a *brucella sp*) (24, 25) y el virus de la fiebre aftosa (18, 19). Con el presente estudio nos propusimos ampliar el campo de investigación de la resistencia a otros agentes virales, incluyendo otras enfermedades de común ocurrencia en nuestro medio, tales como la Estomatitis Vesicular (EV) y la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB).

La EV es una enfermedad infecciosa aguda que afecta a los equinos, bovinos y suinos, producida por un virus de la familia Rhabdoviridae, género vesiculovirus del cual existen más de 10 serotipos, cuyos signos clínicos incluyen la presentación de vesículas en lengua, nariz, ubre y al redor de los rodetes coronarios de las pezuñas (16).

Esta enfermedad es endémica en América y en Colombia circulan los serotipos Indiana y New Jersey (EV-I y EV-NJ) (12), y ocurre con presentaciones de ondas epizoóticas en ciclos que se repiten anualmente desde 1929, año en el que este virus entró al país (16, 28). La mayor incidencia ocurre generalmente entre los meses de diciembre a abril (pico mayor) y de junio a octubre (pico menor) (20). Esta entidad clínica es de mucha importancia en Colombia, no sólo por su similitud con la fiebre aftosa, sino por las cuantiosas pérdidas que ocasiona en las industrias lecheras y ganaderas localizadas en las diferentes áreas (16).

La ecología del virus de EV no es bien entendida aún. Existen muchas preguntas sobre dónde y cómo se mantiene el virus en la naturaleza, cómo se transmite y cómo

se introduce en los hatos libres de infección. Los serotipos Indiana y New Jersey pueden tener diferentes ciclos y se ha demostrado que la infección producida por EV-I es frecuente entre animales arbóreos o semiarbóreos dentro de las zonas enzoóticas, y que el agente se puede aislar a partir de ácaros y mosquitos. Se sugiere, entonces que el virus es sacado de su ciclo natural por vectores; de tal suerte que los animales domésticos sólo serían hospederos accidentales (11).

La RIB es una enfermedad viral con distribución mundial, cuyo agente etiológico es el Herpesvirus bovino 1 (HVB-1), perteneciente a la familia Herpesviridae, subfamilia Alfa herpesvirinae, género varicellovirus. El agente causante de la RIB, la cual se presenta como una enfermedad respiratoria aguda en los bovinos, puede también causar la vulvovaginitis pustular infecciosa y abortos en las hembras, y balanopostitis pustular infecciosa, en los machos (11).

El virus penetra al hospedero por el tracto respiratorio por medio de aerosoles, o por contacto directo con secreciones nasales; la transmisión venérea ocurre a través del coito o de semen contaminado. Este virus tiene la capacidad de establecer un estado de latencia por largo tiempo y producir reactivación de la infección de manera intermitente, al igual que otros virus pertenecientes a la misma familia (11, 12).

En Colombia se aisló el virus de RIB por primera vez en 1972, en muestras obtenidas en matadero, de vacas con historia de abortos; desde entonces el virus ha sido asociado con abortos y problemas reproductivos (13), pero una verdadera asociación etiológica no se ha demostrado y se cuenta con pocos aislamientos del virus; lo cual contrasta con la alta prevalencia de anticuerpos, determinada en encuestas serológicas que muestran una amplia distribución de la infección en el país (1, 3, 29).

En intentos de aislamiento en Antioquia, realizados por Zapata y colaboradores desde 1.993, en 2.100 muestras vaginales no se pudo aislar el virus. Además en este mismo trabajo se caracterizó molecularmente un aislamiento de RIB, hecho por el grupo de trabajo de la Universidad Nacional de Colombia seccional Bogotá, que resultó pertenecer al subtipo molecular 2b, no relacionado con producción de abortos (27).

En un estudio de prevalencia de la infección por HVB-1 en el ganado BON de Antioquia se encontró un nivel bajo de reactivos (11.5%) (23), en comparación con los índices reportados para el departamento y para otras regiones del país, en general, que fluctuaba entre 13% en la costa atlántica y 67% en la población de toros del Urabá antioqueño (29).

Material es y métodos

Cultivos primarios de fibroblastos de ganado BON. Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron 47 cultivos primarios de fibroblastos de ganado BON obtenidos del Repositorio de células del Laboratorio de Virología Facultad de Medicina Universidad de Antioquia. Los cultivos primarios de fibroblastos se replicaron en medio de crecimiento, RPMI-1640 Sigma[®] con 10% de suero fetal bovino y adicionado con 1% de penicilina-estreptomicina.

Células MDBK. Células de riñón bovino, obtenidas del Repositorio de células del Laboratorio de Virología Facultad de Medicina Universidad de Antioquia se replicaron en medio de crecimiento, (MEM Sigma[®] con 10% de suero fetal bovino y 1% de Vitaminas, de aminoácidos no esenciales, de L-glutamina y de penicilina-estreptomicina). Las células MDBK fueron utilizadas para replicar el virus de IBR y como control de susceptibilidad para IBR y EV.

Células Vero 76. Células de riñón de mono verde africano, obtenidas del Repositorio de células del Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, se replicaron en medio de crecimiento. Estas células se utilizaron para replicar y titular los virus EV-I y EV-NJ.

Virus de Estomatitis Vesicular. Monocapas de células Vero 76 fueron infectadas con cepas de referencia de EV (EV-I o EV-NJ) mantenidas en nuestro Laboratorio en botellas de cultivo celular de 25 cm², el virus fue cosechado cuando se observó al microscopio invertido un efecto citopático en el 80 a 90% de la monocapa (18-24 horas post-infección), clarificado por centrifugación, distribuido en alícuotas, titulado y conservado a -70°C hasta el momento de su uso.

Virus de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina. Monocapas de células MDBK en botellas de cultivo celular de 25 cm² fueron infectadas con IBR cepa Bogotá mantenido en nuestro Laboratorio, el virus fue cosechado, alícuotado y titulado como se describió anteriormente para EV.

Titulación de virus. Se determinó el título para EV-I y EV-NJ en células Vero 76 y de RIB en células MDBK. Ambos virus fueron titulados en los 47 cultivos primarios de fibroblastos de BON. Los virus fueron titulados por el método de Dosis Infecciosa Mínima 50% (DIM_{50%}) y se definió como DIM_{50%} la mayor dilución capaz de producir algún efecto citopático en por lo menos el 50% de los pozos infectados.

Fenotipificación de resistencia/susceptibilidad. Para evaluar la resistencia/susceptibilidad a los virus estudiados en cultivos primarios de fibroblastos de ganado BON se

determinó la $DIM_{50\%}$ para cada uno de los tres virus en cultivos de fibroblastos de los animales a probar así: Se sembraron 50.000 células en un volumen de 100 ml de medio de crecimiento en cada uno de los pozos de un plato de 96 pozos, para cada uno de los animales; El plato fue infectado con 100 ml por pozo de diluciones decimales de los virus (4 pozos por dilución), EV-I y EV-NJ desde 10^{-2} hasta 10^{-8} IBR desde 10^{-3} hasta 10^{-9} ; cada plato incluía un control de células no infectadas. Los platos se incubaron durante 72 horas en atmósfera húmeda al 5% de CO_2 a $37^\circ C$, luego de lo cual se evaluó el efecto citopático por observación al microscopio invertido y por tinción con cristal violeta; el título se determinó por el método de Spearman-Kärber. En cada jornada que se realizaba la prueba con animales BON (máximo seis animales por jornada) se incluía la titulación de las mismas diluciones del virus en células MDBK, siguiendo el mismo protocolo. El título obtenido en MDBK en cada jornada, se utilizó como el referente de máxima susceptibilidad para hacer las comparaciones con los fibroblastos de BON respectivos.

Cálculo del índice de resistencia/susceptibilidad (IRS). Este índice es el resultado de la comparación del título obtenido en células MDBK y el título obtenido para cada uno de los animales BON y se expresó como el logaritmo de la división entre el título en células MDBK y el título en células de BON, así: $IRS = \text{Log} (DIM_{50\%} \text{ BHK-21} / DIM_{50\%} \text{ BON})$.

Análisis estadístico. Los datos se analizaron mediante estadística descriptiva determinando promedio, desviación estándar (ds), máximo y mínimo para cada grupo.

Resultados

Una vez obtenidos los lotes de virus a utilizar en los diferentes ensayos, fueron titulados y los $DIM_{50\%}$ resultantes fueron 10^7 , $10^{6.25}$ y 10^8 para EV-I, EV-NJ y RIB respectivamente, estos títulos se utilizaron como control interno de titulación durante el desarrollo de los experimentos, ya que si el control de cada una de las sesiones variaba más de un logaritmo por encima o por debajo del título del stock, los experimentos serían repetidos.

Los $DIM_{50\%}$ en células MDBK en las 14 sesiones de titulación variaron entre $10^{6.5}$ y $10^{7.5}$ para EV-I, $10^{5.25}$ y $10^{6.5}$ para EV-NJ y 10^7 y 10^9 para RIB. Para los 47 cultivos primarios de fibroblastos BON los $DIM_{50\%}$ variaron así: para EV-I entre $10^{3.5}$ y 10^9 , para EV-NJ entre 10^1 y $10^{11.2}$, para RIB variaron entre 10^7 y $10^{9.5}$ (Tabla 1).

Tabla 1. Rangos de variación de los DIM_{50%} en cultivos primarios de fibroblastos BON y Células MDBK (control de susceptibilidad)

	HVB-1		VEV-I		VEV-NJ	
	MDBK	BON	MDBK	BON	MDBK	BON
Máximo	10 ⁹	10 ^{9.5}	10 ^{7.5}	10 ⁹	10 ^{6.5}	10 ^{11.25}
Mínimo	10 ⁷	10 ⁷	10 ^{6.5}	10 ^{3.5}	10 ^{5.25}	10 ¹

Tabla 2. Promedio y desviación estándar (ds), de los DIM_{50%} para cada uno de los virus en células MDBK control de susceptibilidad

Parámetro	HVB-1	VEV-I	VEV-NJ
n	14	14	14
Promedio	10 ⁸	10 ^{6.8}	10 ^{5.8}
ds	0.5	0.35	0.4

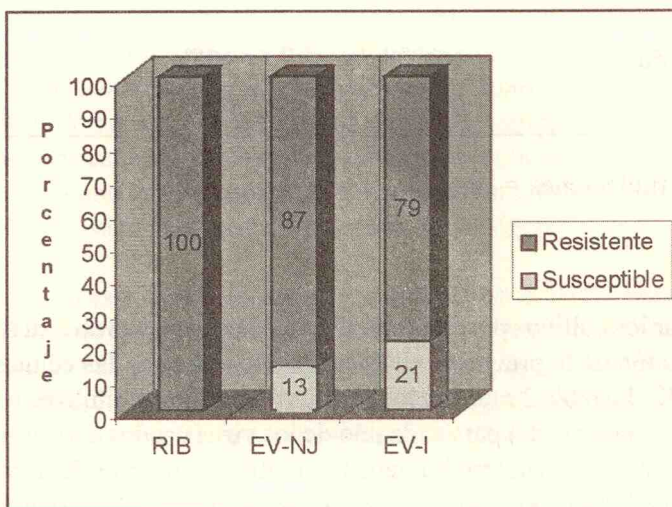
N: Número de titulaciones = 14.

Para categorizar los cultivos primarios de fibroblastos, de acuerdo a su IRS, se tuvo en cuenta la variación de la prueba de titulación de los virus en las células control susceptible MDBK. La tabla 2 muestra los valores promedio del título en células MDBK y la desviación estándar (ds) para cada uno de los virus usados a lo largo de los experimentos como control de susceptibilidad. Los cultivos primarios de fibroblastos BON, para cada uno de los tres virus utilizados, se clasificaron en las categorías resistente (R) y susceptible (S) así: Un cultivo primario se ubicó en el grupo S, cuando el IRS fue menor o igual de dos ds en las células control (la ds de los títulos en células MDBK para EV-I fue 0.35, para EV-NJ 0.4 y para RIB de 0.5), es decir cuando el log de la diferencia entre el DIM_{50%} en las células MDBK (control de susceptibilidad) con el DIM_{50%} de los fibroblastos fue menor o igual a dos ds, si esta diferencia era mayor a dos ds, el cultivo primario fue considerado R; así que para EV-I los cultivos primarios S fueron todos aquellos cuyos IRS fueran ≤ 0.7 y los R cuyos IRS fueron $>$ que 0.7; para EV-NJ, si el IRS fue ≤ 0.8 el cultivo fue S y R si el IRS fue > 0.8 ; para IBR los S fueron aquellos cuyos IRS fue \leq que 1.0 y los R los que el IRS fue > 1.0 (Tabla 3).

Tabla 3. Categorización (S: susceptible, R: resistente) de los cultivos primarios de fibroblastos de ganado BON para cada uno de los tres agentes estudiados. IRS: Índice de resistencia/Susceptibilidad

Categoría	HVB-1	VEV-I	VEV-NJ
S	IRS \leq 1.0	IRS \leq 0.7	IRS \leq 0.8
R	IRS $>$ 1.0	IRS $>$ 0.7	IRS $>$ 0.8

Figura 1. Porcentaje de cultivos primarios de fibroblastos de ganado BON resistentes y susceptibles a la infección por rinotraqueitis infecciosa bovina cepa Bogotá (RIB), virus de estoamtitis vesicular serotipo New jersey (EV-NJ) y virus de estomatitis vesicular serotipo Indiana (EV-I)



Como se observa en la figura 1 de los 47 animales BON fenotipificados, *in vitro*, 37 (79%) fueron susceptibles y 10 (21%) resistentes para EV-I; para EV-NJ 41 (87%) se ubicaron en la categoría S y 6 (13%) en la R y para RIB, el 100% de los cultivos primarios fueron susceptibles, 29 de los cuales (62%) fueron más susceptibles que las células MDBK control de susceptibilidad; de los cultivos primarios que se ubicaron dentro de la categoría de resistentes para EV-I y EV-NJ sólo dos resultaron ser resistentes a ambos serotipos.

Discusión

La investigación sobre la existencia o no de resistencia natural a la infección por virus de Estomatitis Vesicular y de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, en bovinos de la raza BON, es una contribución al conocimiento para la caracterización genética de esta raza de ganado criollo, considerada como un valioso recurso para la producción en nuestro medio. El estudio está inscrito dentro de nuestra línea de investigación sobre resistencia/susceptibilidad del Ganado Criollo colombiano BON a infecciones virales.

Acorde con los resultados descritos, se demostró polimorfismo fenotípico para la resistencia/susceptibilidad, *in vitro*, del ganado BON a la infección por los dos serotipos del virus de EV con una mayor prevalencia del fenotipo de resistencia frente al serotipo Indiana.

Un posible mecanismo para la resistencia a EV podría ser a través del interferón, puesto que este virus es muy interferogénico, ya que posee como genoma un RNA y, durante su replicación en el citoplasma de la célula infectada, pasa por RNA de doble cadena que es el mayor inductor biológico de interferón (12). Otros mecanismos como la apoptosis podrían también estar involucrados, ya que se ha demostrado que algunas células infectadas con virus de estomatitis vesicular entran rápidamente en apoptosis, lo que disminuye la diseminación del virus (15, 17).

Llama la atención que dos serotipos del mismo virus presenten diferente respuesta de resistencia/susceptibilidad en los mismos cultivos primarios, este mismo fenómeno se presentó en otro estudio realizado con virus de fiebre aftosa subtipos A24 Cruzeiro y O1 Campos (18, 19).

En cuanto al virus de rinotraqueitis infecciosa bovina, todos los cultivos primarios de fibroblastos de ganado BON fueron susceptibles; más aún el 62% presentó mayor susceptibilidad que el control de células MDBK, lo que indica, en principio, que todos los individuos probados son igualmente susceptibles; esto es, que no existen polimorfismos en la resistencia frente a este virus.

Para contribuir a la caracterización de los recursos genéticos con los que cuenta Colombia, nuestro grupo de investigación se propuso determinar la resistencia natural del ganado BON a otros agentes infecciosos y se demostró que el gen que codifica para la proteína del macrófago asociada a la resistencia natural (Nramp1) contra patógenos intracelulares, como la *Brucella abortus* y la *Salmonella Dublin*, está presente en forma homocigótica para el alelo de resistencia en 79 de 80 (98.75%) animales genotificados; sólo uno resultó ser heterocigótico (24, 25). También se ha

fenotipificado la resistencia/susceptibilidad, *in vitro*, de este ganado al virus de fiebre aftosa; 55 de 60 (93.3%) animales fueron resistentes, al subtipo A 24 Cruzeiro y 50 de 97 (52.8%) lo fueron al subtipo O1 Campos; además, se demostró que hay correlación entre la capacidad de producción de interferón ante la infección con el virus de la fiebre aftosa y la resistencia a este agente; así, los cultivos primarios de fibroblastos BON altos productores de interferón, 32-64 Unidades internacionales de interferón por mililitro (UIIFN/ml), resultaron resistentes a la infección con ambos subtipos; mientras que en los que se induce baja producción de IFN (2 UIIFN/ml) siempre son susceptibles (19).

De los 47 animales fenotipificados para estos virus, 10 fueron probados también para resistencia al virus de la fiebre aftosa y sólo se encontró una coincidencia de un cultivo que resultó ser resistente tanto a la infección por el virus de la fiebre aftosa A24-C como EV-I, lo que podría estar indicando que los mecanismos, en cada caso, no son los mismos o no operan de la misma manera.

Otros estudios en marcha, tienen el objetivo de evaluar la inducción de IFN tipo I en los cultivos primarios de estos animales ante la infección por los dos serotipos de EV, para establecer si la resistencia a este virus está determinada por la producción de IFN; así mismo, se determinará si la resistencia, *in vitro*, a fiebre aftosa y a EV es mediada por la apoptosis inducida por estos virus en las células infectadas. Por último, será necesario realizar estudios de resistencia *in vivo* para corroborar los resultados obtenidos *in vitro*. Una vez definidos estos fenotipos *in vivo*, y con la ayuda de procedimientos biotecnológicos, será posible aplicar estos conocimientos para mejorar la producción pecuaria del país.

Agradecimientos

A Milady Mogollón, Gloria Mejía, Maribel Martínez, Juan D. Rodas, Omar Saldarriaga y John Jairo Arboleda por su colaboración en el establecimiento del repositorio de cultivos primarios de fibroblastos de ganado BON del laboratorio de Virología de la Universidad de Antioquia y a la Universidad de Antioquia por la cofinanciación del proyecto y por el apoyo económico al Joven Investigador A. Salazar.

Summary

In vitro natural resistance to Vesicular Stomatitis Virus and Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus in Blanco Orejinegro cattle

This report presents the results of a project whose goal was to determine the possible phenotypic diversity in, in vitro, resistance/susceptibility of the Colombian Criollo cattle, Blanco Orejinegro (BON), to the infection with Vesicular Stomatitis Virus (VSV) and Infectious Bovine Rinotracheitis Virus (IBRV). 47 primary fibroblasts cultures belonging to same number of animals were tested by means of viral titration, and the Minimum Infectious Dose 50% by ml ($MID_{50\%}/ml$) was determined by the Spearman karber method. Then the Resistance/Susceptibility Index (RSI) was obtained and the primary fibroblasts cultures were categorized as resistant or susceptible with reference to MDBK cells as susceptible control. For IBRV all primary fibroblasts cultures were susceptible; for VSV serotype Indiana, 37 were susceptible and 10 resistant, and for VSE serotype New Jersey, 41 were susceptible and 5 resistant. Our research group had previously demonstrated phenotypic polymorphism in, in vitro, resistance/susceptibility to foot and mouth disease virus in this cattle breed.

Key Words: *Colombian Criollo Cattle, primary fibroblasts cultures, resistance/susceptibility index, viral replication.*

Referencias

1. Arboleda JJ, Bedoya DA, Rodas JD, Acevedo L, Ossa JE. Estudio virológico y epidemiológico de la RIB en un hato lechero en Antioquia. Rev ACOVEZ 1993; 17: 34-35.
2. Arboleda O. El ganado Blanco Orejinegro. Suplemento ganadero 1980; 1: 42 p.
3. Aycardi EV, Sanclemente M, Cortes E. Prevalencia de anticuerpos para el virus RIB en ganado de carne en Colombia y aislamiento del virus de casos clínicos. Rev Vet y zoot 1977; 30: 14-19.
4. Botero FM. El ganado Blanco Orejinegro. En: Hernández G, Botero M, González F y Rubio R (eds). Razas Criollas Colombianas, Manual de Asistencia Técnica ICA, 1979; 17-51.
5. Botero FM. Influencia de la raza Jersey en el mejoramiento de la producción lechera del Blanco Orejinegro. Trabajo de grado M.V.Z. Universidad de Caldas, Manizales. Colombia. 1958; 75 p.
6. Brownstein D. Host genetic resistance. En: Webster R and Granoff A. Encyclopedia of Virology Academic Press, San Diego, USA, 1994; 554 – 559.
7. Buitrago F, Gutiérrez ID. Potencial genético y productivo del ganado Blanco Orejinegro (BON). En: FEDEGAN, ICA, PRONATA, ASOBON. Censo y caracterización de los sistemas de producción del ganado criollo y Colombiano. Bogotá. 1999; 55-74.

8. Colmenares CR. Investigaciones genéticas sobre el ganado colombiano BON. Rev. Vet. y Zoot. 1951; 5: 40-73.
9. Derr JN, Davis SK, Estrada JL, Ossa JE, Westhusin M, *et al.* Genetic characterization and conservation Colombian criollo cattle. En: Proceedings of the third global conference on conservation of domestic animal genetic resources. Rare breeds international; Queens University, Kingston, Ontario-Canada. 1995; 307-313.
10. FEDEGAN, ICA, PRONATA, ASOBON. Censo y caracterización de los sistemas de producción de ganado criollo y colombiano, Bogotá, 1999; 13-54.
11. Fenner F, Bachman P, Gibbs E. Vet Virol. Orlando Academic Press. 1987; 550 p.
12. Fields B, Knipe D, Howley P (eds). Virology Third Edition. New York. Raven Press, 1995; 1122-1140.
13. Góngora A, Villamil L, Vera V, Parra J, Ramírez G, López G. Aislamiento de un herpes virus Bovino tipo I de secreción nasal y esmegma prepucial en un toro reproductor. Rev Med Vet y Zoot. 1996; 43, 43-46.
14. Hernández G, Martínez G. Producción de leche en clima medio con cruces Holstein y Blanco Orejinegro. Rev. ICA. 1985; 20: 197-202.
15. Horn A, Hommel G, Brahmi Z. FAS mediated cytotoxicity induced degradation of vesicular stomatitis virus RNA transcripts and reduces viral titer. Molecular immunology. 1997; 34: 1055-1055.
16. ICA. La fiebre Aftosa y otras Enfermedades Vesiculares en Colombia. Boletín técnico 1995; 32: 135 p.
17. Koyama H, Arakawa T, Adachi A. Acceleration of virus induced apoptosis by Tumor Necrosis Factor. FEBS Letter. 1998; 475: 179-182.
18. López A, Arango A, Ossa J, Zuluaga FN. Análisis de resistencia/susceptibilidad al virus de la fiebre aftosa en el ganado Blanco Orejinegro BON. Rev. Col. Cienc. Pec. 1999; 12 (supl): 227.
19. López A, Zuluaga FN, Barrera J, Arango A, Ossa J. Fenotipificación del ganado criollo colombiano Blanco Orejinegro (BON) para resistencia/susceptibilidad y producción de IFN γ , contra el virus de la fiebre aftosa. Trabajo de grado Maestría. Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. 2000; 103 p.
20. Morales LF, Piedrahita ID. Estomatitis vesicular en el departamento de Antioquia, aspectos clínicos y epidemiológicos. En Memorias Seminario Internacional Epidemiología molecular de la estomatitis vesicular. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia Universidad de Antioquia, Medellín. 1998; 19-34.
21. Morris CA. Genetics of Disease Resistance in *Bos Taurus* cattle. Animal Genetics Resources. Information. 1998; 23: 1-11.
22. Munévar MG. Blanco Orejinegro, Clave para Cruces. Carta Ganadera. 1990; 27: 4-10.

23. Rodas JD, Arboleda JJ, Zuluaga FN, Trujillo LE, Ossa JE. Estandarización de una técnica de ELISA para RIB y determinación de la prevalencia de infección en hato BON de Antioquia. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 1995;9: 35-39.
24. Saldarriaga OA, Rugeles MT, Velásquez JI, Bedoya G, Ossa JE. Caracterización genotípica de la resistencia natural del ganado blanco orejinegro BON a Salmonella Dublín SL 2250. *Rev. Col. De Cienc. Pec.* 1999; 12 (sup): 234.
25. Saldarriaga OA, Rugeles M T, Velásquez JI, Bedoya G, Ossa JE. Genotipificación del ganado "BON" a la Salmonella Dublín SL 2250. *Rev. IATREIA.* 2000; 13: 92.
26. Templeton J, Smith R, Adams G. Natural Disease Resistance in Domestic Animals. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 1988; 192: 1305-1315.
27. Zapata JC. Rinotraqueitis infecciosa bovina RIB. caracterización molecular de una cepa colombiana de Herpes virus bovino tipo I. Trabajo de grado Maestría. Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. 1999; 89 p.
28. Zuluaga FN, Mejía GM. Estudios epidemiológicos de la estomatitis vesicular en Colombia. En *Memorias Seminario Internacional Epidemiología molecular de la estomatitis vesicular.* Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad de Antioquia. Medellín. 1998; 1-13.
29. Zúñiga L, Ossa J, Hincapié O. Prevalencia de IBR en reproductores de Urabá antioqueño para 1977. *Rev. Col Cien. Pec.* 1978; 1: 135-148.

Estandarización de una técnica de ELISA para rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB) y determinación de la prevalencia de la infección en el hato Blanco Orejinegro (BON) de Antioquia*

Juan D. Rodas, John J. Arboleda, Fabio N. Zuluaga, Luis E. Trujillo, Jorge E. Ossa

Programa de Reproducción, Laboratorio de Virología,
Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia
Investigación financiada por Colciencias y la Universidad de Antioquia

Resumen

Con el objeto de contribuir a la caracterización de la RIB en el país nos dimos a la tarea de estandarizar una prueba de ELISA que nos permitiera realizar el diagnóstico epidemiológico de la infección en forma más económica y logísticamente menos compleja.

Basados en los resultados de 982 sueros previamente probados por Nt, estandarizamos una técnica de ELISA para RIB. El promedio de los delta de densidad óptica para los 796 sueros negativos por la prueba base fue de 0.077 (+/- 0.083 SD) y para los 186 positivos, de 0.52 (+/- 0.22 SD). De acuerdo con estos datos establecimos un punto de corte de 0.27, con el cual logramos una especificidad del 97% y cuya sensibilidad del 92% para el ELISA en suero sanguíneo y una concordancia con la prueba patrón de 96%. Adicionalmente realizamos un estudio de la prevalencia de la infección para el hato Blanco Orejinegro (BON) de Antioquia.

* Artículo publicado originalmente en: Rev Col Cienc Pec, Vol. 9: 1 y 2, pág. 35-39 / 1996.

Se probaron 593 sueros de ganado BON, obtenidos de cinco haciendas y se encontró una prevalencia del 11.5%. Este valor es más bajo que los descritos previamente para la población general en otras regiones geográficas del país. Es posible, de acuerdo con estos datos, recomendar el establecimiento de hatos libres de la infección, como una estrategia adicional para la preservación de esta raza autóctona en peligro de extinción.

Introducción

La RIB es una enfermedad herpética con sintomatología muy variada, pero generalmente asociada con rinotraqueitis, vulvovaginitis o balanopostitis y aborto; ocasionalmente se pueden presentar encefalitis, nefritis, mastitis y conjuntivitis (8,12). Su agente causante, el HVB-1, fué reconocido desde 1956 y en la actualidad se encuentra ampliamente diseminado en todo el mundo. Sólo se encuentran libres de la infección algunos países europeos tales como Noruega, Finlandia, Suecia, Suiza y Dinamarca (1, 12).

En Colombia los primeros informes acerca de la presencia de este agente datan de 1972, año en el cual se lograron tres aislamientos a partir de muestras tomadas de mucosa vaginal y de cervix de animales destinados para sacrificio, en el matadero municipal de Villavicencio, procedentes de fincas con historia de abortos. Posteriormente se llevaron a cabo nuevos aislamientos en hatos lecheros de la sabana de Bogotá y en los Llanos Orientales en 1973 y 1974 respectivamente también, a partir de este mismo año, se realizaron múltiples estudios de prevalencia en departamentos que abarcaban las diferentes regiones de la geografía nacional. Tales estudios detectaron una seropositividad que fluctuaba entre un 13% en la población general de la costa atlántica y un 67% en la población de toros en servicio del Urabá antioqueño (5, 14).

Hasta el presente la técnica de diagnóstico utilizada en Colombia para la detección de anticuerpos contra la RIB ha sido la neutralización viral, la cual aunque es altamente específica, es susceptible de ser superada en sensibilidad, rapidez y costos por otras técnicas como el ELISA.

Aunque se cuenta con múltiples trabajos que muestran evidencia serológica de la enfermedad en hatos de leche y carne, tanto en el departamento de Antioquia como en el resto del país (2,5,10,14), ninguno de estos estudios se ha desarrollado en razas criollas como el ganado BON. El ganado BON es de particular interés en nuestro departamento por considerarse una raza adaptada al medio a través de 500 años de supervivencia en condiciones cuasi-silvestres.

Adicionalmente, la población BON del país no supera los 6.000 ejemplares, de los cuales la mitad son cruzados con otras razas (Asociación BON, comunicación directa). La población de ganado BON en Antioquia se calcula en alrededor de 800 a 1.000 individuos puros, pero no se tienen datos exactos.

El bajo número de ejemplares de esta raza y las características importantes que se le atribuyen, tales como la prolificidad y la rusticidad, esta última entendida como la adaptación al medio, son la mayor justificación para emprender estudios que apunten a su caracterización, recuperación y preservación.

El presente estudio enfocó dos problemas complementarios: primero, estandarizar una prueba de específica, sensible, fácil, y económica para el diagnóstico serológico de la RIB y, segundo usar dicha técnica para establecer la prevalencia de esta infección en el hato BON de Antioquia.

Materiales y Métodos

Producción y titulación del antígeno viral: Para el efecto se utilizó el procedimiento del ELISA para Gitomegalovirus estandarizado por Correa y cols (6). Brevemente, se preparó el antígeno a partir de células MDBK infectadas durante 72 horas, con el virus de referencia (cepa Wisconsin), mediante extracción con tampón de glicina y sonicación; en la misma forma se procesaron células no infectadas como antígeno control. Estas preparaciones se titularon a las diluciones 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400 en platos de 96 pozos de fondo en “U” (NUNC inmunoplate UII) por triplicado, para buscar la dilución en la cual fuera posible hacer una mejor diferenciación entre las densidades ópticas obtenidas en los pozos con y sin antígeno para dos sueros controles positivos y dos sueros controles negativos, previamente definidos mediante neutralización (7), en diluciones de 1:20, 1: 40, 1: 80 y 1: 160.

Estandarización del ELISA: Para determinar el punto de corte con una dilución de antígeno 1:100 y una dilución del suero 1:80, se utilizaron 982 sueros bovinos previamente probados por neutralización (7), de los cuales 389 pertenecían al banco de sueros del laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia y 593 correspondían a sueros de animales de la raza BON, que fueron recolectados, específicamente, para los efectos de este estudio.

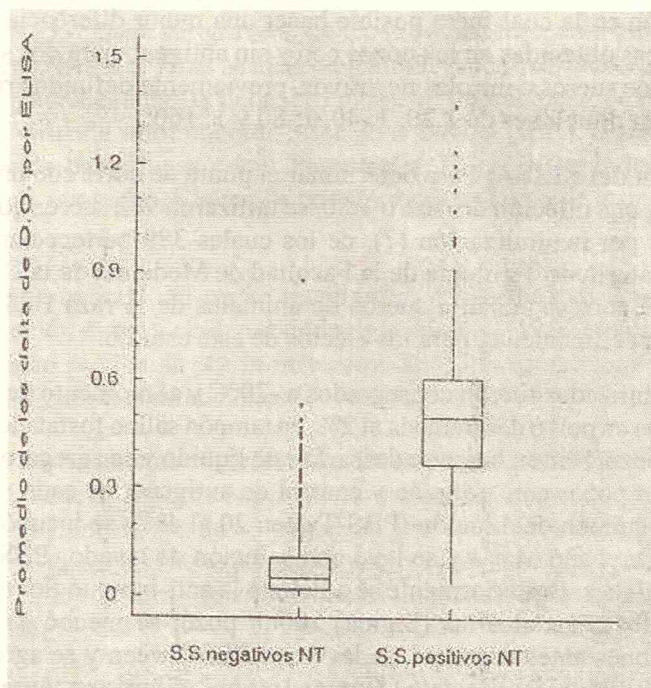
Los platos sensibilizados fueron conservados a -70°C y al momento de su uso fueron tratados con leche en polvo descremada al 2%, en tampón salino fosfatado (PBS 0.15M, ph 7.2), 100 ul/pozo/10min; luego se descartó este líquido y se agregaron 100 ul/pozo por duplicado en pozos con antígeno y control de antígeno, de cada suero a probar diluido 1:80 en tampón de dilución (PBS-Tween 20 al 4%); se incubó 1h/37°C mediante flotación en baño María y se lavó con solución de lavado (PBS-Tween 20 al 1%) en tres ocasiones. Posteriormente se adicionó la anti-inmunoglobulina G bovina conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma) 100ul/ pozo; se incubó de nuevo en las mismas condiciones antes descritas, se lavó con PBS-Tween y se agregaron 100ul/pozo del sustrato P-nitrofenilfosfato (Sigma) 1mg/ml, diluido en tampón de sustrato; se incubó Temp.amb./45 min. en la oscuridad y finalmente se agregaron 50ul/pozo de NaOH 2N para detener la reacción y proceder a la lectura espectrofotométrica a 405 nm (Minireader Uniskan II).

Población de estudio y toma de muestras: Para el estudio se obtuvieron 593 muestras de 5 hatos del departamento de Antioquia ubicados en los municipios de San José del Nus, Barbosa, Medellín, Rionegro y Uramita. Las muestras de 10cc de sangre fueron tomadas por punción de la vena yugular, en tubos al vacío y posteriormente fueron transportadas al laboratorio, bajo refrigeración, donde se separó el suero por centrifugación para conservación a -20°C hasta su uso.

Análisis estadístico: Para la obtención del punto de corte del ELISA se tabularon los delta de densidad óptica de cada suero, obtenidos a partir de la diferencia entre los promedios de los pozos con antígeno y control de antígeno. El punto de corte se calculó con base en el promedio de los delta de absorbancia de los sueros negativos más dos desviaciones estándar; con lo cual se asegura que el 95% de los mismos estén correctamente clasificados (Statgraphics 6.0) (6).

Tamaño de la muestra: basados en la tabla para determinación del tamaño muestral en estudios descriptivos con respecto a una población infinita, el número de sueros utilizados para la estandarización del ELISA (982), brinda un límite de confianza del 99.7% y un margen de error del 5% (4).

Figura 1. Gráfica múltiple de cajas y bigotes para S.S.



S.S. Sueros sanguíneos
D.O. Densidad óptica
N.T. Neutralización

Resultados

Estandarización de la técnica de elisa

De los 982 sueros bovinos probados, 186 resultaron positivos (18.94%) por neutralización y 796 (81.06%) fueron negativos.

Al realizar la prueba de ELISA los sueros negativos presentaron un promedio de delta de absorbancia de 0.077 (+/- 0.083 SD), mientras que para los sueros positivos el promedio fue de 0.52 (+/- 0.22 SD) (véase Figura 1).

La observación de la gráfica de cajas y bigotes de sueros positivos y negativos nos acercó a la aproximación del punto de corte basados en el promedio de los sueros negativos más dos desviaciones estandar (0.24 aprox.), valor por debajo del cual se encontrarían el 95% de los datos negativos en una distribución normal.

A partir de este valor y hasta 0.30 se probó reiterativamente la concordancia entre las pruebas. Finalmente encontramos que 0.27 es el valor con el cual se logra la mayor concordancia entre ambas técnicas (946/982, 96.2%), con una especificidad del 97% (773/ 796) y sensibilidad del 92% (171/186), como se puede apreciar en la siguiente tabla de contingencia. (Tabla 1) que indica los resultados obtenidos por neutralización (NT) y Elisa en suero sanguíneo.

Tabla 1. Resultados obtenidos por NT y Elisa en suero sanguíneo

	Elisa		Total
	Pos	Neg	
NT	171	15	186
Pos	23	773	796
Total	194	788	982

Como puede observarse 15 (1.5%) sueros positivos por neutralización fueron negativos por ELISA y 23 (2.3%) negativos por neutralización fueron positivos por Elisa.

Prevalencia de RIB en el hato BON de Antioquia

La prevalencia de infección con el HVB-1, fue de 11.5% por neutralización y de 12.14% por la prueba de ELISA.

Los resultados serológicos para los hatos muestreados, por cada una de las dos pruebas utilizadas fueron los siguientes. Tabla 2.

Tabla 2. Sueros positivos por NT y Elisa para los hatos BON muestrados en Antioquia

	n	NT	ELISA
ICA-San José del Nus	339	34 (10%)	33 (9.7%)
Universidad de Antioquia	93	5 (5.4%)	7 (7.5%)
Rionegro	74	6 (8.1%)	6 (8.1%)
Universidad Nacional	48	3 (6.3%)	7 (14.6%)
Uramita	39	20 (51%)	19 (49%)
Total	593	68 (11.5%)	72 (12.14%)

De acuerdo con los anteriores resultados la concordancia por ambas pruebas para los 593 sueros BON fué del 98.65 % (585/593)

Discusión

El ELISA ha ocupado un lugar privilegiado entre las pruebas serológicas, en la última década; la rapidez en la obtención de los resultados, su facilidad de ejecución y la gran sensibilidad y especificidad la convierten en una de las herramientas más apropiadas para el diagnóstico serológico de las entidades virológicas en general (3,9,13).

Los resultados del presente trabajo indican que la prueba de ELISA descrita, representa una alternativa diagnóstica altamente específica para RIB, si se la compara con la neutralización como prueba de referencia. Los resultados falsos negativos, es decir positivos por neutralización y negativos por la nueva prueba, podrían atribuirse a la presencia de IgM en individuos infectados en forma aguda o reciente, isotipo que no se buscó en la prueba de ELISA.

De otro lado, los falsos positivos podrían ser explicados como falsos negativos de la neutralización, bien por baja sensibilidad de la prueba o por un fenómeno de potenciación dependiente de anticuerpos, como el descrito en otras familias virales como la Flaviviridae (11). La segunda alternativa no pudo ser confirmada, pero la primera sí explicó por lo menos una tercera parte de la discordancia, pues al probar de nuevo los sueros por neutralización en una dilución de 1:4 se detectaron anticuerpos. De esta manera, sin dejar de reconocer la prueba de neutralización como aquella que por su especificidad sigue siendo la prueba patrón para el HVB-1, se debe tener en cuenta que esta técnica, por emplear cultivos celulares, requiere de equipos y destrezas especializadas y de períodos de tiempo más largos para la obtención de resultados.

Adicionalmente, el desarrollo de técnicas de diagnóstico más eficientes y menos dependientes de la importación de insumos, le permite a los investigadores del país el desarrollo de proyectos tendientes a caracterizar, a un menor costo y con mayor participación desde el punto de vista de la creatividad, los problemas nacionales de salud.

En cuanto a la prevalencia de la RIB observada en el hato BON de Antioquia, podríamos decir que es baja (11.5%), si la comparamos con trabajos previos en el departamento y en otras regiones (2,5,10,14). Esto sugiere la posibilidad de erradicación basados en las experiencias de otros países (1).

De otra parte la seropositividad podría estar relacionada con las condiciones de manejo de cada hato si tenemos en cuenta que la prevalencia en la hacienda de Uramita cuya población representa menos del 10% del número total de datos, aporta el 30% del total de animales seropositivos.

En resumen, se estandarizó una prueba que permite iniciar estudios de prevalencia más extensos y comparativos entre varias regiones y razas de ganado; y la técnica ha sido aplicada al estudio del problema en la raza BON que representa un potencial genético que es necesario salvar y caracterizar, por ser el resultado de la adaptación cuasi-natural a las condiciones del país a través de 500 años de sobrevivencia en este medio.

Summary

Standardization of an ELISA technique for Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) and determinadon of the prevalence of infection in the Blanco Orejinegro (BON) cattle from Antioquia, Colombia.

With the objective of contributing to the characterization of IBR in Colombia, we committed ourselves to standardize an ELISA test to improve the serologic diagnostic BHV 1 infection.

For the purpose we used 982 neutralization tested serum samples. The delta. averanges of optical density for 186 and 796 positive and negative sera by ELISA, were 0.52 and 0.077 with standard deviations of 0.22 and 0.083 respectively. A cut off point was established at 0.27 and the specificity and sensibility were 97 and 92 % respectively. The % of concordance between ELISA and NT was 96%.

A prevalence study was carried out in BON cattle from Antioquia. 593 (representing 80% of the universe) serum samples were taken and tested from 5 pure breeding farms. 11.5 % of prevalence was found. This value is lower than those four in previous studies in Colombia. The results suggest that the establishment of a herd free of infection could be a good choice to aid in the objective of preserving autochthonous Colombian cattle.

Referencias

- 1 ACKERMAN M, MULIER H, BRUCKNER L. et al. Eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Comparative study of sixteen enzyme-linked Suizerland: review and prospects. *Vet Microbiol* 1990; immunosorbent assays for the detection of antibodies to 23: 365-370.
- 2 ARBOLEDA J, BEDOYA D, RODAS J.(1991). Estudio sobre, la Rinotraqueitis Infecciosa bovina en un hato lechero del Valle del Aburrá. Trabajo de Grado. Fac. de Med. Vet. y de Zoot. Univ. de Antioquia, 1991.
- 3 BARRERA M,PERALTA E L y NODA J. Técnica ELISA para detectar anticuerpos contra el virus de la lecheros del altiplano norte y del oriente de Antioquia. rinotraqueitis infecciosa bovina. *Rev. Salud Animal* 1987;9:96-101.
- 4 BETANCUR J, GARCIA L, MANOTAS R, MONTOYA F SANCHEZ F Metodología de la investigación en ciencias de la salud. 2ed Medellín: Imprenta Universidad de Antioquia. 1992. 244p. 12.
- 5 CIAT. Informes anuales. Salud animal. 1972, 1973,1974,1975.
- 6 CORREA M, ARANGO A, OSSA J. Estandarización de un metodo de ELISA para Citomegalovirus humano. *Acta Médica Colombiana* 1990; Vol 15, No 4: 180-186.
- 7 DEREGT D,CHO H J and KOZUB G C. A comparative evaluation of two sencitive serum neutralitation test for bovine herpesvirus-1 antibody. *Can J Vet Res* 1993; 57;56-59.
- 8 KRAMI'S J A,QUAK S,WEERDMEESTER K, et al. Comparative study of sixteen enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to bovine herpesvirus 1 in cattle. *Veterinary Microbiology* 1993; 35; 11-21.
- 9 FENNER F BACHMAN P GIBBS E, et al. *Veterinary Virology* Orlando: Academic Press, 1987. 660p.
- 10 SOSSA S, FLOREZ V ARANGO P Estudio serológico para la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) en hatos lecheros del altiplano norte y del oriente Antioquia. Trabajo de grado. Fac de Med Vet y Zoo- Univ. de Antioquia,1982.
- 11 STPHENSON JR(1988).Flavivirus vaccines. En: *Vaccine* Vol 6
- 12 TIKOO S.K., CAMPOS M. and BABIUK L.A. Bovine Herpesvirus-1: Biology, pathogenesis and control. *Advances in Virus Research*. 1995 Vol 45 p. 191-223.
- 13 WITTEK HANNEMAN P DOPATKA H, GIESENDORF B Technical improvements of a commercial ELISA to detect antibodies against bovine herpesvirus 1. *Med Microbiol Immunol* 1989 178: 9-20.
- 14 ZÚÑIGA I., OSSA J., HINCAPIE O. Prevalencia de IBR en reproductores del Urabá Antioqueño 1977. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 1978; Vol 1 No 2: 135-148.

Phenotypic polymorphism of BON cattle fibroblasts to replicate foot-and-mouth-disease virus preliminary association with IFN production *

Albeiro López^{a,*}, Fabio N. Zuluaga^a, José Barrera^b, Ana E. Arango^a,
John J. Arboleda^a, Gloria Mejía^a, Maribel Martínez^a, Patricia Balsero^b,
Milady Mogollón^a, Jorge Ossa^a

^aLaboratorio de Virología, Grupo Inmunovirología-Biogénesis,
Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia

^bLaboratorio de Biotecnología Animal, Corpoica-CEISA

Abstract

Natural resistance to viral infections has become an item of high relevance. The aim of the present study was to examine possible *in vitro* polymorphism for resistance/susceptibility (R/S) to the Foot-and-mouth disease virus (FMDV) subtypes A24-Cruzeiro (A24) and O1-Campos (O1) in Blanco Orejinegro (BON) cattle. Initially a skin fibroblast bank derived from 97 BON individuals was established. Each individual primary fibroblast culture was challenged with either FMDV subtype, A24 and O1. The primary fibroblast cultures tested presented different R/S patterns to infection with these virus subtypes. A larger number of cultures were highly resistant to the A24 subtype than to the O1 subtype *in vitro*. Furthermore, high interferon producing fibroblasts (≥ 32 International Units per ml [IU/ml]) presented a very good correlation with resistance to the A24 subtype, and moderate correlation to the O1 subtype, while fibroblasts producing low amounts of interferon (2 IU/ml) correlated with susceptibility to both subtypes. To our knowledge this is the first report of its kind in cattle, and definitively the first to report polymorphism for R/S to FMDV in BON cattle, a colombian criollo breed on its way to extinction.

Keywords: Natural resistance; BON cattle; Foot-and-mouth disease virus

* Artículo original.

Introduction

With 500 years of adaptation to the tropical coffee-producing areas in Colombia, the Blanco Orejinegro (BON) criollo cattle, brought by Christopher Columbus on his second trip (Arboleda, 1980; Buitrago 2001), has become an autochthonous natural resource. At present, due to the pressure of specialized foreign races, this autochthonous livestock tends towards extinction and along with it, a genetic potential that has never been characterized. This race as well as the other six criollo breeds existing in Colombia undoubtedly carry important genetic traits selected by the demands for survival under extremely difficult climatic conditions. These conditions have probably never allowed full expression of the productive potential of the breeds. On the other hand, these animals have never been subjected to technically directed selection (Arbleda, 1980).

Presently, there is a population of 2866 pure bred BON cattle in Colombia (Martinez, 1999). According to the parameters of the Food and Agriculture Organization (Bodo, 1990), the position of this race is highly vulnerable to extinction.

There exist traditional popular ideas of resistance of BON animals to illnesses, and a few scientific studies have clearly demonstrated resistance of BON cattle to the larva of *Dermatobia hominis* (Botero, 1979). We therefore began testing the hypothesis that among the BON cattle there exists diversity for resistance/susceptibility (R/S) to viral infections.

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) is a member of the aphtovirus genus, in the Picornaviridae family; its genome consists of a single positive RNA strand (Rueckert, 1996). There exist seven serotypes (A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3 and Asia 1) and 60 subtypes which affect domestic and wild artiodactyls (Mann and Seller, 1990). FMDV was first characterized in Colombia in 1950 (ICA, 1975) and while to date the A and O serotypes have been detected, only the O serotype circulates actively, mainly in the Southwest; importantly FMDV has been eradicated from the Northwestern part of the country (OPS, 1998; ICA, 2000).

In 1938 Pratt (cited by Morris, 1998), observed that during an FMDV epidemic in a herd in France, a cow remained disease-free; 14 years later the same herd was affected again by FMDV and this time six cows were apparently resistant to the infection. All six animals were descendants of the original resistant cow. This anecdote suggests some degree of heritability of a resistant phenotype for this virus.

The concept of natural resistance (Templeton et al., 1988) to viral infections was studied as of the first half of the XXth century when Webster (cited in Brownstein, 1994) demonstrated this phenomenon in mice infected with Yellow fever virus. Among

the mechanisms responsible for this natural resistance, the action of interferon (IFN) has been the most actively studied but other possible mechanisms include lack of cellular receptors that prevents the virus from penetrating the cell (Brown et al., 1994; Samson et al., 1996), apoptosis in which case the infected cell dies thus stopping viral replication and dissemination (O'Brien, 1998), the action of the tumor necrosis factor (Koyama, 1998), and production of nitric oxide (Kreil and Eibl, 1995) that inhibits viral replication.

The synthesis of α/β IFN or type I IFN (designated here IFN) can be induced in practically all cells of the organism and viral infection is one of the most potent IFN inducers. However other agents such as bacteria, mycoplasma and protozoa, or some of their constituents, can also induce IFN synthesis in certain cell types, especially in mononuclear phagocytes. Viral induction of IFN is mediated by double-stranded RNA (dsRNA); such dsRNAs are uncommon constituents of cells but are produced as intermediates or final products during viral RNA replication (Vilcek and Sen, 1996). The direct antiviral actions of IFN have been attributed mainly to transcriptional induction of three cellular genes (Boehm et al., 1997; Stacheli, 1990; Zhou et al., 1993): 1) the Mx gene that encodes a protein responsible for the inhibition of Influenza virus development and is also active against Vesicular stomatitis virus (VSV) (Pavlovic et al., 1990; Stacheli, 1990), 2) the 2'-5' oligoadenylate (2-5A) synthetase gene, dependent on dsRNA and responsible for the inhibition of the development of members of the Picornaviridae family (Chebath et al., 1987; Hassel, 1993), and 3) the protein kinase gene dependent on dsRNA that codes for a protein active against VSV and Vaccinia virus (VV) (Vilcek and Sen, 1996).

After activation of 2-5A synthetase by IFN, the enzyme promotes the polymerization of ATP to 2'-5' oligoadenylate chains, and these in turn activate RNase L latently present in all mammalian cells, which when activated is able to degrade both viral and cellular single-stranded RNAs, inhibiting protein synthesis and virus replication (Hovanessian, 1991).

Working with a poxvirus, Castelli et al. (1997; 1998a; 1998b) studied the role of RNase L that acts in the 2-5A synthetase system and follows a pathway that leads to caspase-independent apoptosis. These authors showed that RNase L is involved in the antiviral activity of IFN through the regulation of apoptosis. Díaz-Guerra et al. (1997) reached the same conclusions working with VV.

The aim of the present study was to examine the possible polymorphism for R/S to FMDV in primary fibroblast cultures of BON cattle. We show that there exists a higher degree of polymorphism in R/S to the FMDV A24 than to the FMDV O1 subtype; moreover this resistance correlates either very well or moderately with IFN production depending on the subtype examined.

Materials and methods

BON fibroblast bank and primary cell cultures

Ear biopsies (one biopsy per animal) were taken from five herds of pure BON cattle in Antioquia, Colombia: El Progreso Farm, Universidad de Antioquia, located in the municipality of Barbosa; Paysandú Farm, Universidad Nacional Seccional Medellín, in the municipality of Rionegro; Centro de Investigaciones el NUS, Corpoica, in the municipality of San José del Nus; Fondo Ganadero de Caldas Farm, in the municipality of Puerto Nare; and a private farm located in the municipality of Fredonia.

Unless specified, all products were purchased from Sigma. Briefly the protocol used to obtain primary cell cultures was as follows: the ear was washed, shaved and disinfected with alcohol and iodine. The biopsy (diameter 0.8 mm) was removed with a metallic punch taker, and kept at 4°C in transport medium containing MEM with 2 nM L-glutamine, 1% MEM vitamins, 1% MEM non essential amino acids, 2% penicillin-streptomycin-amphotericine B and 2% fetal bovine serum (FBS) [Gibco®], pH 7.2-7.4. Less than 8 h after sampling, the biopsy was washed three times with PBS containing 2% penicillin-streptomycin-amphotericine B, pH 7.2-7.4 and the skin was discarded. The cartilage and the subcutaneous tissues were minced finely, placed in 25 cm² cell culture flasks with just enough growth medium (MEM with 1% 2 nM L-glutamine, 1% MEM vitamins, 1% MEM non essential amino acids, 1% penicillin-streptomycin-amphotericine B and 10% FBS, pH 7.2-7.4) to cover them, taking care that they would not float, and incubated at 37°C in 5% CO₂. Every third day the flasks were examined with an inverted microscope to evaluate the progress of the culture, and 50% of the medium was replaced with fresh growth medium. When the fibroblasts proliferated to 30-40% confluence, the remaining pieces of tissue were discarded by gently shaking with PBS and again the cells were fed with 50% of used medium and 50% of fresh grown medium. When 80% confluence was reached, the cells were trypsinized and cultured in 150 cm² flasks. Once the cells covered about 80% of the surface, they were trypsinized, centrifuged and cryopreserved.

Cell lines

Baby hamster kidney clone 21 (BHK) cells (Laboratory of Animal Biotechnology, Corpoica-CEISA, Bogotá, Colombia), were used to replicate the FMDV subtypes. In addition the virus titer in BHK cells served as control of susceptibility in the experiments of phenotypification of BON cells. It is known that BHK cells when infected with FMDV produce high levels of - but are insensitive to - IFN, due possibly to a genetic defect in the expression of the IFN receptor (Chisangaram et al., 1999).

African green monkey kidney clone 76 (Vero) cells (Virology Laboratory, University of Antioquia) were used to titrate the VSV serotype New Jersey (VSV-NJ), and also as substrate for biological quantification of IFN. These cells are sensitive to IFN, but are incapable of producing IFN (Emery and Morgan, 1979).

Viruses

The Reference A24-Cruzeiro (A24) and O1-Campos (O1) FMDV subtypes were from the Laboratory of Animal Biotechnology, Corpoica-CEISA, Bogotá. To prepare viral stocks, BHK monolayers were infected with either of the FMDV subtypes and the virus crop was harvested 8-24 h post-infection, when the cytopathic effect reached 80-90% of the culture. The supernatants were collected and centrifuged at 800xg for 10 min at 4 °C, and the cell debris discarded. Aliquots of 100 ml were stored at -70 °C. Two virus lots of A24 and O1 each were used. The virus was titrated in BHK cells by the Minimal Infectious Dose 50% per ml ($MID_{50\%/ml}$) method that is defined as the smallest amount (or highest viral dilution) of virus stock per ml capable of causing a cytopathic effect (plaque appearance or total cell destruction) in at least 50% of the infected wells in 72 h.

VSV-NJ obtained from the Virology Laboratory, University of Antioquia was used in the biological test to quantify IFN induced by FMDV in primary BON fibroblasts. VSV-NJ was titrated by plaque forming units (PFU) on Vero cells.

R/S to FMDV

To evaluate the R/S of primary cultures of BON fibroblasts to FMDV subtypes A24 and O1, the $MID_{50\%/ml}$ was determined for each subtype. Each well of two 96-well plates was seeded with 5×10^5 cells in 50 μ l of growth medium. Decimal dilutions of each virus subtype from 10^{-2} to 10^{-7} (14 wells/dilution) were added to each well (50 ml/well); each plate included a control without virus. The plates were incubated for 72 h at 37°C in 5% CO_2 , and stained with crystal violet. The titer was determined by the method of Spearman-Kärber (Rovozzo and Burke, 1973). An internal BHK titration control was consistently included for each subtype.

R/S index (RSI)

This index results from the comparison of the titer obtained in BHK cells with that obtained for each of the BON fibroblast cultures, and is expressed as the logarithm of the titer in BHK cells over the titer in BON cells, such that:

$$RSI = \text{Log} (\text{BHK } MID_{50\%/ml} / \text{BON } MID_{50\%/ml}).$$

IFN production and quantification

To quantify the IFN produced when primary fibroblast cells were stimulated with each virus subtype, a biological test was used. Briefly, 250,000 fibroblasts from each animal were plated in each well of two plates of 24 wells; one plate was infected with A24 and the other with O1, in either case with 10 MID_{50%} in a final volume of 1 ml. Supernatants were collected after 12, 24, 36 and 48 h, a pool was made with the supernatants of each primary fibroblast culture, treated with 50 ml of 0.1N HCl/ml of pool and stored at -70 °C. Quantification of IFN was made over Vero cell monolayers in plates of 24 wells: the monolayers were treated with dilutions (from 1: 2 to 1: 128) of the pool of supernatants containing the IFN produced by viral infection. Fetal calf serum (FCS) was used as negative control and supernatants from BHK cells infected with FMDV were the positive control. After 24 h the monolayers were infected with 20 PFU/well of VSV-NJ and covered with growth medium containing 0.4% agarose. One international unit (IU) of IFN is the dilution that prevents the formation of 50% of plaques in comparison with a monolayer infected without treatment with IFN (Ardoin, 1983).

Statistical design

The data were analyzed by descriptive statistics, and the T-student test was applied to determine the level of significance. Association analysis was also performed by means of the Spearman correlation coefficient. All the analyses were carried out with the program STATISTICA® 6.0 and a significance level was set at $p \leq 0.05$.

Results

Cell Bank

Primary fibroblasts from 97 BON individuals were stored in the cell culture repository of the Virology Laboratory, Group of Immunovirology, University of Antioquia. Of these, 60 were tested for R/S towards both FMDV subtypes A24 and O1, and the remaining 37 were tested for R/S towards subtype O1 only.

Resistance/Susceptibility

Table 1 shows the average values of the titer, and the standard deviation (SD) for each of the two virus lots in each FMDV subtype tested with BHK cells. The SD fluctuated between 0.37 and 0.58. Therefore a log dilution difference is approximately within 2 SD and this corresponds to an RSI of 1, indicating no significant difference. This is

congruent with the fact that normally in virus titration the error level is of one dilution (Rovozzo, 1973). The standard error for the two lots of the O1 subtype was 0.23 and 0.13 and for the A24 subtype it was 0.12 and 0.14 respectively, indicative of the reliability of the test.

On this basis all fibroblast primary cultures whose RSI was <1 were considered susceptible; those whose RSI was between 1 and 3 as resistant, and those whose RSI was >3 as very resistant.

Table 1. Average titer, standard deviation (SD) and standard error (SE) of the MID_{50%}/ml for BHK cells infected with two lots of either FMDV subtype.

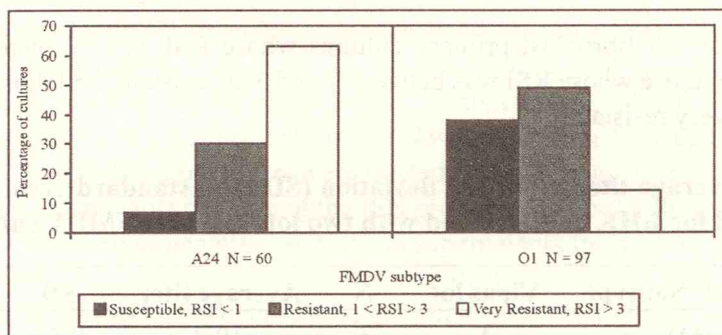
FMDV Subtype	Virus lot	N	Average titer	SD	SE
O1	1	6	10 ^{7.8}	0.57	0.13
	2	10	10 ^{6.4}	0.42	0.13
A24	1	8	10 ^{6.9}	0.36	0.12
	2	7	10 ^{5.7}	0.37	0.14

N: number of experiments performed with each lot.

For the BON fibroblasts the MID_{50%}/ml varied between 10^{2.0} and 10^{7.1} for the A24 subtype and between 10^{3.0} and 10^{8.8} for the O1 subtype (not shown). The O1 subtype tended to present higher MID_{50%}/ml in BON fibroblasts than the A24 subtype. Both virus subtypes led to total destruction of the BHK monolayer (control of susceptibility), as did the O1 subtype in bovine fibroblasts. On the other hand the cytopathic effect of the A24 subtype was limited to plaques in all fibroblast lines except one. This unique individual was the only one to present a MID_{50%}/ml for the subtype A24 higher than the BHK control. For the O1 subtype however, four fibroblast lines presented titers higher than the control.

Fig. 1 shows that for subtype A24, 7% (4/60) of the primary fibroblast BON cultures were susceptible, while 37% (36/97) were susceptible for subtype O1. In the resistant category, there were 30% (18/60) for subtype A24, and 48% (47/97) for subtype O1. In the very resistant category, there were 63% (38/60) for subtype A24 and 14% (14/97) for subtype O1. Consequently there was a wide diversity in R/S in the BON fibroblasts.

Figure 1. Percentage of BON fibroblast cultures in each category of resistance according to their behaviour toward infection with FMDV subtypes A24 or O1. N: Number of cultures tested with each subtype. In parenthesis are the numbers of primary cell cultures in each category of R/S.



The behaviour of the individual fibroblast lines is clearly distinct for each virus subtype. While for the A24 subtype the highest frequency is in the very resistant category, for subtype O1 it is in the resistant category.

Table 2 contains the descriptive analysis of the RSI by category for each subtype. The SD for the RSI data is small, except for the susceptible category of the A24 subtype where it is 1.0. The RSI variation for the A24 subtype ranges from -1.2 to 5.6, whilst for the O1 subtype it ranges from -0.6 to 4.8. Thus the phenotypic polymorphism is larger in the A24 subtype.

Table 2. Descriptive statistics of data of RSI in each of the R/S category for the FMDV subtypes A24 and O1 in primary BON fibroblast cultures.

Subtype A24					
Category	N	RSI average	SD	RSI Max.	RSI Min.
VR	38	3.8	0.6	5.6	3.0
R	18	2.2	0.6	2.9	1.3
S	4	0.2	1.0	0.9	-1.2
Subtype O1					
VR	14	3.6	0.5	4.8	3.0
R	47	2.0	0.5	2.9	1.1
S	36	0.5	0.4	1.0	-0.6

N: Number of cultures in each category of resistance. VR: very resistant, R: resistant, S: susceptible.

Of the 60 BON fibroblast cultures that were phenotyped with the two FMDV subtypes, there was a 33% (20/60) coincidence between the categories; i.e. 20 of the individual fibroblast cultures were in the same category for the two virus subtypes (Table 3). Ten of these 20 were classified as very resistant for both subtypes, 7 as resistant, and 3 as susceptible. Interestingly the 40 remaining cultures that did not coincide between categories for the two subtypes did not follow a similar pattern: of the 28 cultures that were very resistant to A24 but did not coincide, 19 were resistant and 9 were susceptible to O1. Of the 11 cultures that were resistant to A24 and did not coincide, 1 was very resistant and 10 were susceptible to O1. Additionally one culture was susceptible to A24 but resistant to O1.

Table 3. Number of primary BON fibroblast cultures that coincide or do not coincide with the phenotype for the FMDV subtypes A24 and O1.

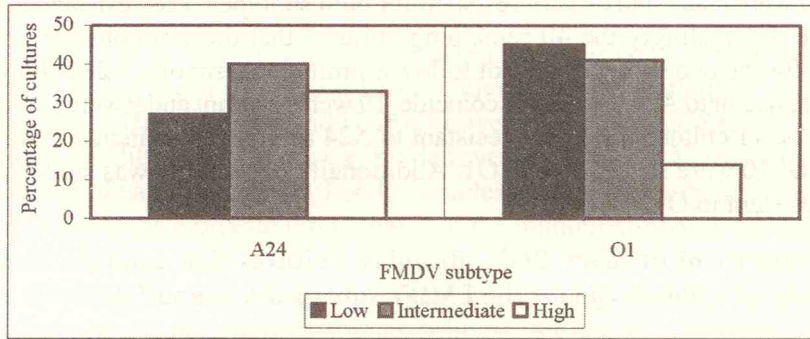
	Total	A24	O1
Coincidence	20	10 VR	10 VR
		7 R	7 R
		3 S	3 S
No Coincidence	40	28 VR	19 R
			9 S
		11 R	1 VR
			10 S
		1 S	1 R
Total	60	60	60

VR: very resistant, R: resistant, S: susceptible

IFN and R/S to FMDV

Thirty of the 60 BON fibroblast cultures tested for R/S to both FMDV subtypes were randomly selected to determine the level of IFN production. BHK supernatants contained IFN in a titer of 64 IU while FCS was devoid of any antiviral activity. IFN production in BON fibroblasts varied between 2 and 64 IU/ml for both subtypes. The cultures were classified as low (2 or 4 IU/ml), intermediate (8 or 16 IU/ml) and high (32 or 64 IU/ml) producers. These categories are shown in Fig. 2 for both subtypes. The correlation coefficient (r) between RSI and IFN production was $r=0.49$ for A24 and $r=0.60$ for O1 (data no shown); i.e. the correlation was moderate. When comparing the capacity of the two subtypes to induce IFN, A24 was the better, inducing an average of 22 IU/ml of IFN (SD=21), whereas subtype O1 induced an average of 12 IU/ml of IFN (SD=13), with a statistically significant value of $p=0.038$ (data no shown).

Figure 2. Distribution of BON fibroblast cultures according to the category of IFN production induced by infection with FMDV subtype A24 or O1. N: Number of cultures tested with each subtype.



Finally, We analyzed the relationship between IFN production and the R/S category of the cultures (Table 4). For the A24 subtype, 30 samples were examined. All 10 cultures that produced high IFN levels belong to the very resistant category, while of the 12 intermediate IFN producer, six were very resistant and six were resistant, and of the eight primary fibroblast cultures with low levels of IFN production, two were very resistant, two were resistant and four were susceptible. It is remarkable that all the cultures that were high IFN producers were very resistant and that all the low producers were susceptible to infection with the A24 subtype.

Table 4. Descriptive statistics of IFN production for each category of R/S to FMDV subtypes A24 and O1 in primary BON fibroblast cultures. ¹: Number of cultures in each category of R/S.

FMDV Subtype	Category R/S	Number of cultures in each level of IFN production	IFN production (IU/ml)				
			High	Intermediate	Low	Average (SD) Min Max	
A24	VR (18) ¹	10	6	2	31.3 (23.3)	64	4
	R (8)	0	6	2	11.2 (5.7)	16	4
	S (4)	0	0	4	3.0 (1.2)	4	2
O1	VR (7)	2	4	1	23.1 (20.0)	64	2
	R (15)	2	8	5	14.5 (9.4)	64	4
	S (7)	0	0	7	3.7 (0.8)	4	2

Average: average production of IFN in each category of R/S. SD: standard deviation. Max and Min: maximum and minimum level of IFN production in each category of R/S. VR: very resistant, R: resistant, S: susceptible

A total of 29 primary fibroblast cultures were challenged with the O1 subtype. However, no clear correlation could be detected between the pattern of R/S and IFN production (Table 4). Of the four cell cultures that were high IFN producers, two were very resistant and two were resistant; of the 12 intermediate IFN producers, four were very resistant and eight were resistant, and of the 13 low IFN producers, one was very resistant, five resistant and seven susceptible. With this virus subtype as with the A24 subtype, all the primary fibroblast cultures classified as susceptible were low IFN producers.

Moreover, as shown in Table 5 there were significant differences in the capacity of the cultures to produce IFN between the three categories of R/S ($p < 0.05$). The only exception was between the very resistant and resistant category for O1 subtype where the difference in IFN production was not significant ($p = 0.07$).

Table 5. Levels of significance from the comparison of the average production of IFN for the three categories of R/S of both FMDV subtypes.

Categories compared	Level of significance	
	A24	O1
VR-R	0.03*	0.07
VR-S	0.03*	0.02*
R-S	0.01*	0.04*

*Statistically significant differences.

Discussion

Foot-and-mouth disease is one of the most important diseases in the bovine cattle industry worldwide. The economic importance of this illness is due to the highly infectious nature of FMDV and to its international impact on the trade of animals and their by-products, in addition to the high costs of vaccination, quarantine, veterinary medical attendance, and the high expenses and time incurred in the recovery of weight loss and milk production.

This pioneer work, the first scientific study to related R/S to FMDV subtypes and IFN production in bovine, confronts locally prevalent ideas of resistance of the criollo livestock to certain viral diseases. The results indicate that there is a wide phenotypic polymorphism in R/S. The fact that the correlation between R/S phenotype and IFN production was moderate $r = 0.5$ and $r = 0.6$ for the A24 and O1 subtypes respectively (López-Herrera, 2000), suggests that other mechanisms in addition to IFN production are implicated in the R/S patterns observed. Also it is necessary to test four other antiviral factors which may behave like IFN in the capacity to withstand pH 5.

This phenotypic diversity observed for R/S to FMDV and to IFN production in BON cattle is compatible with other studies that demonstrated - when searching for sequence tandem repeats, and contrary to expectations - a very low level of endogamy (0.122) in spite of the continued decrease in the BON cattle population (Moreno, 1998).

It is remarkable that a higher percentage of BON fibroblasts are very resistant and resistant to subtype A24 than to O1 (Table 2), and also that the cytopathic effect produced by each virus subtype follows the same pattern in BHK cells, but is different in BON fibroblasts.

Recently, Chinsangaram et al. (2001) using *Escherichia coli*-expressed porcine and bovine IFN, demonstrated that both IFN were equally effective in inhibiting replication of FMDV subtype A12 in cells such as primary fibroblasts from bovine embryo kidneys. This is in agreement with the present study in which infection of BON cattle fibroblasts with either subtype of FMDV (A24 or O1) induces IFN production. In our study IFN production follows significantly different patterns when cells are infected with subtype A24 or with O1. In particular the frequency of high versus low IFN producers was inverted for A24 and O1 (Fig. 2); IFN effectively inhibits replication of FMDV, since fibroblasts that are high IFN producers are very resistant to A24 and very resistant or resistant to O1. Indeed none of the fibroblast cultures producing high levels of IFN were susceptible.

Additionally, it seems that the action of IFN on A24 restricts the cytopathic effect to small foci. For O1 the action of IFN appears early (prior to tissue damage), but if the virus achieves (a) first infection round(s), all restriction to its replication is overcome. In summary, A24 as well as O1 induce high levels of IFN, but in a small proportion of cultures, and depending on the IFN concentration an "all or nothing"-type effect on O1 replication was observed.

It is well known that FMDV serotypes differ *in vitro* in their affinity for cellular receptors. Indeed in cell culture, serotype A maintains its affinity for the $\alpha_v\text{-}\beta_3$ integrin receptor as it does *in vivo*, whereas serotype O also acquires affinity for the heparan sulfate receptor *in vitro* a receptor of high expression (Neff et al., 1998; Sa-Carvalho et al., 1997). It would be interesting to determine if this change in affinity by a receptor, can explain the high susceptibility to O1 subtype in the present study, in which case our R/S patterns to O1 would not be useful *in vivo*.

In conclusion, variability was demonstrated in the response capacity of primary BON fibroblasts to the FMDV A24 and O1 subtypes. The capacity and effect of IFN production are not absolute but relative, and depend on the stimulus, the cell type and possibly the context. Clearly, viral stimuli as closely related as FMDV A24 and O1 can affect the cell substrate in very different manners.

The results presented here lead to two clearly defined research orientations. On one hand, they lead to basic research which should with time help to elucidate the specific and seemingly different mechanisms of induction and action of IFN in the control of each virus subtype, and to determine mechanisms other than IFN that may control viral infection, since the correlation between R/S and IFN production provides only a partial explanation for the phenotype. On the other hand they lead to applied research by correlating these results with *in vivo* studies, so as to ultimately proceed to selective mating and to the construction of families of resistant and susceptible animals for further studies as well as for application in the cattle industry.

Acknowledgements

We are grateful to the Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), the Universidad de Antioquia and the Universidad Nacional de Colombia Seccional Medellín that have maintained the BON cattle during the last 40 years. We thank Anne-Lise Haenni for her kind revision and correction of the manuscript. This work was made possible thanks to the financial support of the Centro para el Desarrollo de la Investigación from the University of Antioquia, Colciencias-Colombia and the Group of Immunovirology.

References

- Arboleda, O., 1980. El ganado blanco orejinegro. Suplemento ganadero. 1, 1-42.
- Ardoin, P., 1983. Virus et diagnostic virologique. Techniques de base. Maloine S.A., Paris, pp. 912-914.
- Bodo, I., 1990. Methods and experiences with *in situ* preservation of farm animals. Animal genetic resources. A global programme for sustainable development. FAO 80, 85-102.
- Boehm, O., Klamp, T., Groot, M., Howard, C., 1997. Cellular responses to interferon g. Ann. Rev. Imm. 15, 749-795.
- Botero, F.M., 1979. El ganado blanco orejinegro. In: Razas Criollas Colombianas. Manual de Asistencia Técnica, 21, ICA Bogota, pp. 17-61.
- Brown, K., Hibbs, J., Gallinella, G., Anderson, S., Lehman, E., McCarthy, P., Young, N., 1994. Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). N. Engl. J. Med. 330, 192-196.
- Brownstein, D., 1994. Host genetic resistance. In: Webster, R., Granoff, A. (Eds.). Encyclopedia of Virology, Academic Press, GB, pp. 664-669.
- Buitrago, F., 2001. Raza blanco orejinegro (BON). In: Los Animales Domésticos Criollos y Colombianos en la Producción Pecuaria Nacional. ICA Bogotá, pp. 13-21.

Castelli, J., Hassel, B., Wood, K., Li, X., Amemika, K., Dalakas, M., Torrence, P., Youle, R., 1997. A study of the interferon antiviral mechanism: apoptosis activation by the 2-5A system. *J. Exp. Med.* 186, 967-972.

Castelli, J., Hassel, B., Maran, A., Paranjape, J., Hewitt, J., Li, X., Hsu, Y., Silverman, R., Youle, R., 1998a. The role of 2'-5' oligoadenylate-activated ribonuclease L in apoptosis. *Cell Death Diff.* 5, 313-320.

Castelli, J., Wood, K., Youle, R., 1998b. The 2-5A system in viral infection and apoptosis. *Biomed. Pharmac.* 52, 386-390.

Chebath, J., Benech, P., Revel, M., Vigneron, M., 1987. Constitutive expression of (2'-5') oligo A synthetase confers resistance to picornavirus infection. *Nature* 330, 587-588.

Chisangaram, J., Picone, M., Grubman, M., 1999. Ability of foot-and-mouth disease virus to form plaques in cell culture is associated with suppression of alpha/beta interferon. *J. Virol.* 73, 9891-9898.

Chinsangaram, J., Koster, M., Grubman, M., 2001. Inhibition of L-deleted foot-and-mouth disease virus replication by alpha/beta interferon involves double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J. Virol.* 75, 5498-5503.

Diaz-Guerra, M., Rivas, C., Esteban, M., 1997. Activation of the IFN-inducible enzyme RNase L causes apoptosis of animal cells. *Virology* 236, 354-363.

Emery, J.M., Morgan, M.J., 1979. Regulation of the interferon system: Evidence that vero cells have a genetic defect in interferon production. *J. Gen. Virol.* 43, 247-252.

Hassel, B.A., Zhou, A., Sotomayar, C., Marin, A., Silverman, R.H., 1993. A dominant negative mutant of 2-5 A-dependent RNase suppresses antiproliferative and antiviral effects to interferon. *EMBO J.* 12, 3297-3304.

Hovanessian, A.G., 1991. Interferon-induced and double-stranded RNA-activated enzymes: a specific protein kinase and 2'-5' oligoadenylate synthetases. *J. Interf. Res.* 11, 199-205.

ICA (Instituto Colombiano Agropecuario), 1975. La fiebre aftosa y otras enfermedades vesiculares en Colombia. *Boletín técnico* N° 32, 136p.

ICA (Instituto Colombiano Agropecuario), 2000. *Boletín epidemiológico semanal* (Mayo 14 al 20) de alertas para la acción inmediata.

Koyama, A., Arakawa, T., Adachi, A., 1998. Acceleration of virus-induced apoptosis by tumor necrosis factor. *FEBS Lett.* 426, 179-182.

Kreil, T., Eibl, M., 1995. Viral infection of macrophages profoundly alters requirements for induction of oxide synthesis. *Virology* 212, 174-178.

López-Herrera A., 2000. Fenotipificación del ganado Blanco Orejinegro (BON) para resistencia-susceptibilidad y producción de interferón alfa-beta contra el virus de la fiebre aftosa. MSc Thesis, Corporación Ciencias Básicas Biomédicas. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 83p.

Mann, J., Sellers, R., 1990. Foot-and-mouth disease virus. In: Dinter, Z., Morein, B. (Eds.). *Virus Infections of Vertebrates. Vol 3: Virus Infections of Ruminants.* Elsevier Publishers. New York. pp. 503-512.

- Martínez, G. (Ed), 1999. Censo y caracterización de los sistemas de producción del ganado criollo y colombiano. Fedegan, ICA, Pronatta. 158p.
- Moreno, F. M.Sc. Thesis, 1998. Diversidad y relaciones filogenéticas del ganado criollo colombiano. Corporación Ciencias Básicas Biomédicas. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.; 125p.
- Morris, C., 1998. Genetics of disease resistance in *Bos taurus* cattle. *Animal. Gen. Res. Inf.* 23, 1-11.
- Neff, S., Sá-Carvalho, D., Reider, E, Mason, W., Blystone, S., Brown, E., Baxt, B., 1998. Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin $\alpha_v\beta_3$ as its receptor. *J. Virol.* 72, 3587-3594.
- O'Brien, V., 1998. Viruses and apoptosis. *J. Gen. Virol.* 79, 1833-1845.
- OPS (Organización Panamericana de la Salud), 1998. Boletín epidemiológico. 19, 5-6.
- Pavlovic, J., Zurcher, T., Haller, O., Stacheli, P., 1990. Resistance to influenza and vesicular stomatitis virus conferred by human MxA protein. *J. Virol.* 64, 26-31.
- Rovozzo, G, Burke, C., 1973. *A Manual of Basic Virological Techniques*. Prentice-Hall, Inc. New Jersey, pp. 64-93.
- Rueckert, R., 1996. Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Fields, B., Knipe, E., Howley, P. (Eds.). *Fields Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 609-654.
- Sa-Carvalho, D., Reider, E., Baxt, B., Rodarte, R., Tanuri, A., Mason, P., 1997. Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J. Virol.* 71, 5115-5123.
- Samson, M., Libert, RF., Doranz, B., Ruckert, J., Liesnard, C., Farber, C., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R., Collman, R., Doms, R., Vassart G., Parmentier, M., 1996. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382, 722-725.
- Stacheli, P., 1990. Interferon-induced proteins and the antiviral state. *Adv. Virus Res.* 38, 147-200.
- Templeton, J., Smith, R., Adams, G., 1988. Natural disease resistance in domestic animals. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 192, 1306-1315.
- Vilcek, J., Sen, G., 1996. Interferons and other cytokines. In: Fields, B., Knipe, E., Howley, P. (eds). *Fields Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 375-399.
- Zhou, A., Hassel, B., Silverman, R., 1993. Expression cloning of 2-5 A-dependent RNase: A uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell* 72, 753-765.

Estudio serológico para el virus de parainfluenza-3 en el hato BON en el departamento de Antioquia *

Sadoh Molina, Hernando Castaño, John J. Arboleda, Juan F. Cadavid, O. Zapata

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Antioquia

Resumen

Se realizó una encuesta serológica para la determinación por IH de los reactores positivos a PI3 en los núcleos del ganado BON, existentes en algunas regiones de Antioquia. Se encontró una prevalencia de un 50.83 %, 86.36%, 52.06% , 76.34 % que corresponden a los sitios geográficos de San José del Nus, Rionegro, Santa Elena y el Hatillo, respectivamente.

Introducción

El virus de PI3, Es uno de los cuatro tipos de virus de Parainfluenza clasificados dentro del género Paramyxovirus perteneciente a la familia Paramixoviridae (7,8,15). Los viriones son pleomórficos, normalmente filamentosos o redondos, con un diámetro de 150 - 300 nm o más; el genoma esta formado por una molécula lineal de sentido (negativo) de ARN cadena sencilla (7,8). La hemoaglutinación es el marcador de virus más comúnmente empleado en el laboratorio, la prueba de inhibición de la hemoaglutinación generalmente es preferible a la prueba de neutralización con fines diagnósticos, para la identificación de cepas y la titulación de vacunas (3, 6, 13).

* Artículo publicado originalmente en: Rev Col Cienc Pec. Vol. 11: 2, pág. 81-86 / 1998.

La infección se disemina rápidamente en los bovinos que se hallan en contacto estrecho, que son probablemente el principal reservorio y la fuente habitual de infección para otros animales. El elevado predominio de anticuerpos en los animales adultos indica la existencia de reinfecciones frecuentes (3, 8).

Como en todos los virus enzoóticos, el predominio de anticuerpos aumenta con la edad. Parece ser que no existe diferencia significativa en la susceptibilidad a la infección por razón del sexo o la raza. La mayor parte de los bovinos infectados experimentalmente dejan de eliminar virus por la secreción nasal de 8 a 10 días después de la exposición. La frecuencia con la cual se presenta el PI3, indica la existencia de infecciones persistentes o de un reservorio natural distinto a los bovinos capaces de reinfectar las poblaciones ganaderas (8, 13, 14).

El correspondiente aislamiento del virus en vacunos con enfermedad respiratoria, el hallazgo del virus PI3 en fetos abortados, las numerosas referencias de enfermedades respiratorias tras la infección experimental de terneras susceptibles indican que, bajo condiciones apropiadas, los bovinos pueden desarrollar la enfermedad cuando se infectan experimentalmente con virus PI3 (3, 8).

La infección por PI3 puede ser grave si ha existido una infección anterior con otros agentes. Frecuentemente el virus se aísla en ganado vacuno de ceba, en el cual se han realizado investigaciones sobre la fiebre de embarque, comúnmente se encuentra acompañada con los virus de rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), diarrea viral bovina (BHV-1), especies bacterianas como *Pasteurella*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*; *Corynebacterium*, *pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* grupo D (3, 8, 9, 10, 14).

La infección experimental del tracto respiratorio de terneros susceptibles produce fiebre, tos, secreción nasal y ocular abundante y aumento de la frecuencia respiratoria. La enfermedad producida por la infección de PI3 suele ser grave cuando cursa simultáneamente con otras infecciones (3, 6, 8-10).

La inoculación experimental en 6 fetos in útero produjo aborto en dos de ellos e infección en los demás. En otro experimento se demostró que la infección fetal es improbable si la hembra gestante posee anticuerpos séricos inhibidores de la hemoaglutinación cuando tiene lugar la exposición. Debido al gran predominio de los anticuerpos a PI3, los autores sugirieron que es improbable que se trate de una causa de aborto importante (8).

Los virus de PI3 y de IBR obstaculizan la función de los macrófagos alveolares al inhibir la fusión de los lisosomas y los fagosomas y así preparan el camino para infecciones secundarias con *Pasteurella* y otras bacterias en terneros sometidos a estrés (15).

Los síntomas y las lesiones no son lo suficientemente característicos para realizar el diagnóstico clínico de la PI3. Los brotes de infecciones respiratorias en terneros o la fiebre de embarque hacen que se considere al PI3 como un factor coadyudante o predisponente. Esta sospecha puede confirmarse mediante el aislamiento del virus o la identificación del antígeno viral por inmunofluorescencia (8, 10).

En el diagnóstico serológico, el predominio de anticuerpos es tan grande que es raro encontrar grupos de bovinos sin confirmación serológica de la infección, por lo que las muestras de suero únicas, tienen una utilidad relativa con fines diagnóstico. La seroconversión o los aumentos significativos (cuatro veces el título de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación) son indicadores de infección, pero no pueden indicar, de forma concluyente, que el PI3 haya sido la causa de los síntomas observados (7, 8, 10).

El virus PI3 puede aislarse de la secreción nasal y ocular, o de la sangre de animales vivos en las primeras fases de la infección. Si se realiza la necropsia a los pocos días después de haber tenido lugar la exposición, puede aislarse de pulmón, tráquea, laringe, cornetes y de los ganglios linfáticos del tracto respiratorio. El virus puede aislarse también a partir de homogenizados de tejidos, de líquido torácico y de pulmón de los fetos abortados (8, 10).

La inmunidad a la vacunación contra PI3 o la exposición natural es más parcial que completa, por lo que los bovinos con anticuerpos séricos pueden infectarse y enfermarse ante una posterior exposición (7, 8).

Los anticuerpos nasales pueden ser producidos localmente, lo que hace que se produzca una resistencia a la infección. Muchos terneros poseen anticuerpos adquiridos por medio de la ingestión de calostro, puede darse una variación individual y duran de 10 a 23 semanas; en algunos casos pueden durar hasta 8 meses y cuando padecen una infección es menos grave. La inmunidad pasiva puede o no interferir con la vacunación, depende del título de las inmunoglobulinas en el ternero, de la dosis de vacuna y de la vía de administración (8,9).

Cuando los animales superan la infección con virus PI3, se protegen temporalmente 6 a 12 meses contra la reinfección o bien, ésta cursa clínicamente inaparente. Los anticuerpos fijadores del complemento persisten menos tiempo que los neutralizantes e inhibidores de la hemoaglutinación (7, 14).

Existen vacunas inactivadas con formalina o con diversos adyuvantes, las cuales estimulan la producción de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación en forma más eficaz que las suspensiones acuosas. Se han empleado éstas unidas a bacterias de

Pasteurella multocida y *Pasteurella hemolytica*. La inocuidad de los productos inactivados permite su empleo en hembras bovinas gestantes y en circunstancias en las que, a juicio del clínico, están contra indicadas las vacunas de virus vivo modificado. Otras vacunas son las preparadas en cultivos de tejidos y atenuadas mediante un corto número de pases en serie de aplicación intramuscular y está contraindicada en hembras preñadas (8).

Las vacunas intranasales fueron producidas inicialmente en 1969 en los Estados Unidos a partir de una cepa del virus vivo, modificado por gran número de pases en cultivos celulares; más tarde se combinó con vacuna de IBR. La vacunación intranasal se considera más parecida a la vía natural de infección para estimular localmente los distintos componentes del sistema inmune celular y humoral (8).

El propósito de este estudio fue determinar por medio de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH) los seroreactores positivos a PI3 en el ganado BON, en el departamento de Antioquia.

Materiales y Métodos

Se realizó un estudio descriptivo en el cual se emplearon un total de 418 muestras existentes en el banco de suero de la sección de virología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, los cuales estaban conservados a -70°C , obtenidos en cuatro hatos diferentes, en varias áreas distribuidas como se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Fechas y lugar de toma de muestras para el presente estudio.

Fecha	Lugar	n	Machos	Hembras
22/10/92	U. Nal	49		49
24/11/92	U. de A.	93	1	92
23/03/93	ICA-Nus	166	31	135
11/03/95	Rionegro	110	1	109

Inhibición de la hemoaglutinación: Se utilizó la microtécnica descrita por Rodríguez y col. (10) la cual consiste básicamente en lo siguiente: cada suero se trató con 100 ml de glóbulos rojos de cobayo al 50 %, luego se centrifugaron a 1500 r.p.m./5 min. Con el sobrenadante se prepararon diluciones dobles en la suspensión de antígeno de PI3 (facilitado por el ICA Bogotá y replicado en células MDBK en el laboratorio de virología de la Facultad de medicina de la Universidad de Antioquia), la cual tenía 10

UHA/ 50 ml y se empezó en 1:10 hasta 1:640; la mezcla del suero y el antígeno se incubó una hora a temperatura ambiente, al finalizar este período se adicionó a cada dilución del suero más el antígeno, 50ml de glóbulos rojos de cobayo al 0.5 %. La lectura se realizó a los 30 minutos y el título de cada muestra fue la dilución más alta donde estaban completamente inhibidas las 10 UHA de antígeno.

Resultados

En esta investigación se encontró una prevalencia a PI3 de 68.89% (288/418) (Figura. 1), los títulos de anticuerpos variaron desde 10 hasta 640 (tabla 2).

La tabla 3 y la figura 2 muestran la distribución de los títulos de anticuerpos contra PI3 en los núcleos de ganado BON de acuerdo con la procedencia, en los cuales los porcentajes de reactores positivos fueron de un 57.83%, 76.34%, 53.66% y 86.36%, que correspondieron a San José del Nus (ICA) , Hatillo (U de A) , Santa Helena (U. Nal) y Rionegro, respectivamente.

Tabla 2. Distribución de los títulos de anticuerpos a PI3 en núcleos de ganado BON en el departamento de Antioquia por la prueba IH.

Título*	Sueros	
	n	Porcentaje
≤ 10	130	31.10
20	88	21.05
40	107	25.39
80	66	15.78
160	13	3.11
320	12	2.87
640	2	0.47
Total	418	100

* Inverso de la dilución

Figura 1. Reactores positivos a PI3 en los núcleos de ganado BON en el departamento de Antioquia por la prueba de IH.

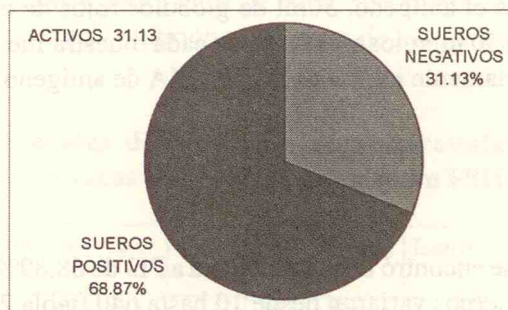


Figura 2. Reactores positivos a PI3 en el ganado BON de acuerdo a la procedencia en el departamento de Antioquia.

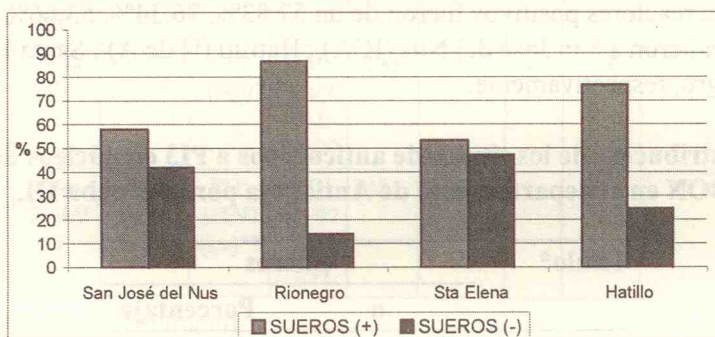


Tabla 3. Distribución de los títulos de anticuerpos contra PI3 en el ganado BON de acuerdo a la procedencia en el departamento de Antioquia.

Título*	Procedencia							
	San José del Nus(1)		Hatillo (2)		Santa Elena (3)		Rionegro (4)	
	muestra	%	muestra	%	muestra	%	muestra	%
≤ 10	70	42.16	22	23.65	23	46.93	15	13.63
20	25	15.06	24	25.80	15	30.61	24	21.81
40	44	26.50	34	36.55	7	14.28	22	20.00
80	22	13.25	11	11.82	3	6.12	30	27.20
160	2	1.20	0	-	0	-	11	10.00
320	3	1.80	2	2.10	1	2.04	6	5.45
640	0	-	0	-	0	-	2	1.81

*Inverso de la dilución

Discusión

En este estudio se encontró una prevalencia de 68.89 % a PI3 en núcleos de ganado BON existentes en Antioquia; lo anterior está de acuerdo con una investigación realizada por Ruiz y Carrillo en 1979, en la cual hallaron una seroreactividad a PI3 en reproductores bovinos de Urabá, del 40.5 % en donde se definió que títulos de anticuerpos 1:20 indicaban haber padecido la infección o haber estado en contacto con el virus (13).

Los altos porcentajes de reactores positivos en los núcleos de BON existentes en Antioquia (Figura.1), se deben posiblemente a la consecución de pie de cria en la granja experimental el Nus, en donde Cataño en 1982 halló una prevalencia a PI3 del 50%. Además, debido a la evidencia serológica a PI3 hallada en esta investigación es necesario aislar y caracterizar hasta donde sea posible el virus, para establecer la causa etiológica de trastornos respiratorios y reproductivos en ganado BON. Lo anterior concuerda con lo sugerido para IBR, en donde se establece la necesidad de hacer un esfuerzo interinstitucional para crear un servicio de diagnóstico permanente y sistemático con el fin de lograr esclarecer el problema no solamente de IBR (1) sino también a otros virus como el de la PI3.

En Colombia el virus PI3 parece estar implicado en la presentación del síndrome conocido como fiebre de embarque, en compañía de otras entidades como IBR, en donde a pesar de la alta frecuencia serológica, su evidencia clínica ha sido controvertida por la ausencia específica de la enfermedad. Por lo anterior el esclarecimiento del problema de la PI3 en nuestro país es complejo. Podría especularse que probablemente el virus de PI3 y el del IBR circulante en nuestro medio producen una infección benigna por lo cual es necesario continuar esta línea de trabajo para medir el verdadero impacto en nuestro país.

Una vez obtenido el virus en el laboratorio se podrían estandarizar nuevas técnicas de diagnóstico tales como inmunoensayos, las cuales tienen mayor especificidad y sensibilidad que las pruebas de Inhibición de la hemoaglutinación y permiten realizar estudios epidemiológicos tanto en suero como en leche en poblaciones más numerosas, como también medir la respuesta de anticuerpos post inmunización, en el supuesto que se establezca un programa de prevención y control mediante el uso de vacunas, las cuales ya están disponibles comercialmente en Colombia.

Summary

In a survey of 418 Bovine sera from Blanco Orejinegro (BON) cattle were tested by hemoagglutination inhibition (HI) to Parainfluenza-3 (PI3) virus. The prevalence found for different regions of Antioquia were as follows: San José del Nus (50.83%), Rionegro (86.36%), Santa Elena (52.06%), Hatillo (76.34%). It's necessary to determine the economical impact of PI3 in the Antioquia Bovine population of Antioquia.

Referencias

1. Arboleda JJ, Rodas JD, Bedoya D. Estudio sobre rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) en un hato lechero del Valle del Aburra. Trabajo de Grado. U de A. 1991
2. Berrio P, Caledón O. Caracterización de dos cepas del virus PI3 . Aisladas de bovinos con problemas respiratorios. Archivos de Medicina Veterinaria. Universidad Austral de Chile. 22v: N.2: 169-171.1990.
3. Blood DC, Radostits OM. Medicina Veterinaria. 7a ed. Interamericana Mc Graw Hill. 1992. p. 966-967
4. Cataño BA, Salazar O, Zuluaga RE. Estudios serológicos para el virus PI3 en el gariado de la estación agropecuaria del Nus. Tesis de grado U de A. 1982.
5. Engen EL. Changes in Phospholipids of Alveolar Lining Material in calves after aerosol exposure to bovine herpes viral II or virus : Am.J. Vet. Res. 1991; 52: 675-677.
6. Fenner F, Bachmann P, Murphy F, et. al. Veterinary Virology. Orlando Academic Press, Inc 1987. p. 485-492
7. Horshe F. Inmunología de los animales domésticos. Zaragoza: Acribia. S.A. 1983. p. 256-257
8. Kahrs R. Enfermedades viricas del ganado vacuno. Zaragoza: Acribia S.A 1985. p. 213225
9. Mazorra C, Gutiérrez G. Revista de Producción animal. Estudios epizootiológicos comparativos entre las unidades suministradoras de terneros y la recrias receptoras. Rev prod anim 1986; 2: 153-158.
10. Mohanty SB, Dutta SK. Virología veterinaria. México: Nueva editorial Interamericana S.A., 1983. p.149-151.
11. Perez J, Sione D. Estudios serológicos de la infección por virus de PI3 en bovinos de Antioquia. Revista de la Escuela Nacional de Salud Publica. Medellín: 3v. N 1. Enero Juni 1977.
12. Rodríguez G. et al. Manual de técnicas en microbiología. Documento de trabajo numero 18, ICA 1983. Bogota, 1978.
13. Ruiz H, Carrillo R. Estudio serológico para brucelosis y PI3 en reproductores bovinos del Urabá Antioqueño. Trabajo de grado Facultad Medicina Veterinaria Y Zootecnia U de A. 1979.
14. Shibuta H. Encyclopedic of Virology . Edited by Robert G. Webster. Allan Granoff. Academic Press Limited. 1994. p. 1031-1036.
15. Tizard I. Inmunología veterinaria. 4a ed. Interamericana Mc. Graw Hill. 1995 p. 281-492.

Analysis of polymorphisms in 1908str1934 locus of the 3' UTR of the Nramp bovine gene in tree cattle breeds *

Omar A. Saldarriaga, Gabriel Bedoya, Jaime I. Velásquez, Jorge E. Ossa, María T. Rugeles

¹Grupo de Inmunovirología-BIOGENESIS and ²Laboratorio de Genética Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia,

³Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad de Antioquia,

Summary:

The Nramp gene has been associated with natural resistance to intracellular microorganisms in several species including bovine. Recent evidence suggests an association between polymorphism in the 3'-UTR of this gene with resistance/susceptibility (R/S) to Brucella abortus as determined in vivo and in vitro. In this study we tested for the variability of the STR within the 3'-UTR of Nramp in Colombian BON cattle and compared the genotypes with those of Holstein and Brahman, which were recently introduced into this country. In BON as well as in Holstein we found the resistance-associated allele 175 fixed in both populations. In Brahman, 175 was also present with a frequency of 0.467 but additionally, in this breed there appeared five other alleles and among them two previously unreported: 183 and 185. Together these results suggest that the 175 allele in the 3'-UTR Nramp may be an ancestral allele in cattle and if this is true the association with the resistance/susceptibility trait remains undefined.

* Artículo original.

Introduction

Resistance to infectious diseases is usually a complex genetic trait and recent data suggest that several R/S associated genes are involved in more than one infectious disease (Vidal et al., 1995). The gene Nramp coding for a Natural resistance - associated macrophage protein, has been identified as the candidate gene controlling innate resistance to numerous intracellular pathogens such as *Salmonella*, *Leishmania* and *Mycobacteria*, in mice (Vidal et al., 1993; 1994). Nramp orthologous genes have been identified in several vertebrates species such as human (Vidal et al., 1993), chicken (Hu et al., 1997), swine (Tuggle et al., 1997), equine (Horin et al., unpublished), and in ruminants like sheep, red deer (Mathews & Crawford, 1998), American bison (Feng et al., Texas A&M University, College Station, TX USA, unpublished), Water buffalo (Hashad et al. Texas A&M University, College Station, TX USA, unpublished) and bovine (Feng et al., 1996).

The Nramp gene expresses exclusively in the monocyte / macrophage lineage and encodes a phosphoglycoprotein (Vidal et al., 1996) that belongs to an ancient family of membrane proteins (Cellier et al., 1995). Recent evidence supports the idea that one of its roles in mouse macrophages resistant to *Mycobacterium bovis* is to transport metal ions such as iron into the bacteria containing phagosome where it serves as a catalyst of the Fenton / Haber- Weiss reaction to increase the capacity of the cell to limit bacterial growth (Kuhn et al. 1999; Zwilling et al, 1999).

Feng et al. 1996 cloned the cDNA bovine homologous of the mouse Nramp; the gene was mapped on BTA 2 (chromosome 2), syntenic loci conserved in mice and humans and it is known that it encodes for a protein of 548 residues.

Horin et al., 1999 found a complex pattern microsatellite within 3' untranslated region (3' UTR) Nramp bovine gene. When they compared the original sequence of Feng with the sequence found in unrelated cattle there appeared a variation in a GT repetition (STR) and a transversion T@G in the 1782 position of the 3' UTR. The original sequence has a 1782/T + (GT) = (GT) and two of the clones obtained by Horin have 1782/G + (GT) = (GT) This investigator proposed the designation Nramp1.1 for Feng's sequence and Nramp 1.2 for the new allele.

The functional significance of this new allele in resistance/susceptibility is still unclear. However, preliminary studies have shown that polyphormism, based in single stranded conformational analysis (SSCP) in the 3' UTR of bovine Nramp presented a significant association ($P=0.0089$) with the phenotype of resistance/susceptibility in 22 unrelated animals, previously phenotyped using an *in vivo* challenge of virulent *Brucella abortus* (Feng et al., 1996). The different patterns in SSCP are due to the size differences in the 3'UTR STR and so far only one (175) of four alleles has been associated with resistance to *B. abortus* (Adams et al., Texas A&M University, College Station, TX USA, Personal communication).

Association of Nramp with resistance/susceptibility was first described in mice where it was found that a transition 783 G→A producing a change from G169D in the Nramp protein changes the susceptibility to *M. bovis* from a resistant to susceptible phenotype (Vidal et al., 1993). In humans, also polymorphism in the 3' UTR has been associated with susceptibility to tuberculosis (Bellamy et al, 1998).

The breed BON (Blanco Orejinegro) is one of 8 Colombian Criollo cattle breeds derived from the animals brought by Christobal Columbus in his second trip. This breed in spite of being traditionally relegated to poor husbandry and the worsening of these conditions imposed by the introduction of foreign specialized breeds such as Brahman and Holstein, still has a high genetic variability comparable to Africans bovine populations (Carvajal et al, 1998). This BON breed characterizes itself by its adaptability to diverse ecological conditions, such as those found in the tropic; including tolerance to heat and to internal and external parasites, ability for grazing and browsing and a remarkable capacity to use low-quality forages. Additionally, this breed has shown high longevity and good fertility (Martinez, 1995). This work belongs to a research line whose main goal is to characterize the BON breed to obtain good arguments for its rescue from the "at risk" condition in which it is currently classified; specifically, we studied the STR variability within the 3' UTR of the Nramp gene to further look for association of some alleles in this microsatellite locus with R / S to intracellular pathogens such as Brucella.

Material and Methods

Bovine Populations: Samples were collected from 131 bovine representing 3 different pure breeds, BON (*Bos taurus*), Holstein (*Bos taurus*) and Brahman (*Bos Indicus*). A description of the sample is presented in Table 1.

Table I. Cattle population surveyed

Breed	Geographical localization	Sample size
BON (<i>Bos taurus</i>)	San José del Nus and Santa Elena. **	72
Brahman (<i>Bos indicus</i>)	La Pintada.**	76
Holstein Friesian (<i>Bos taurus</i>)	San Pedro and Santa Elena**	60

**Antioquia state- Colombia

DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction (PCR): DNA was extracted with the phenol chloroform technique (Sambrook et al., 1989) from peripheral blood. The segment (nucleotide positions 1813-1988) which contains an GT repeat array in the 3' UTR of Nrap gene, was amplified by PCR using the following primers (FW 5'-AAGGCAGCAAGACAGACAGG-3' and RV 5'-ATGGAACTCACGTTGGCTG-3') this sequences were kindly provided for Dr. G. Adams, (Texas A&M University, College Station, TX USA). 200 ng of DNA were amplified in a volume of 25 μ l as follows: 7.5 pmol of each primer, 0.3 units of Taq DNA (PROMEGA, Madison, USA), 1mM of MgCl₂ and 150 μ M of each dNTP were incubated (95°C/ 2 min, 30 cycles (94°C /45 sec, 63°C /30sec, 72°C/ 60 sec), 72°C/ 7min); for this procedure we used a 2400 GeneAmp PCR system (Perkin Elmer, Norwalk CT, USA). Additionally, in order to compare the products between the 175/175 BON and Holstein we amplify another fragment among the nucleotides 1697 up to 2203 using the following primers (FW 5'-GAGAAGGGGAGGACCTCGGG-3' and RV 5'-CAGTTTGGAGCCTGGGTCCC-3') published previously by Feng et al, 1996 and the same reaction conditions as described above. The PCR products were confirmed in a 2% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide.

Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis (SSCP): SSCP of the PCR-products was carried out as follows: The PCR products were denatured (90°C/2min) and subjected to electrophoresis in a 6% nondenaturing polyacrylamide gel. The migration patterns were resolved using silver nitrate (Sigma, St. louis, USA) and the samples were compared (Orita et al., 1989).

Allelic Size Determination: The size of the allele was determined only in those samples exhibiting a different SSCP migration pattern, with reference to a control homozygous sample of known size (175 pb) previously characterized by Adams G. et al, Texas A&M University, College Station, TX USA; (personal communication) using a genetic analyzer ABIPRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA), with the GENESCAN and GENOTYPER software.

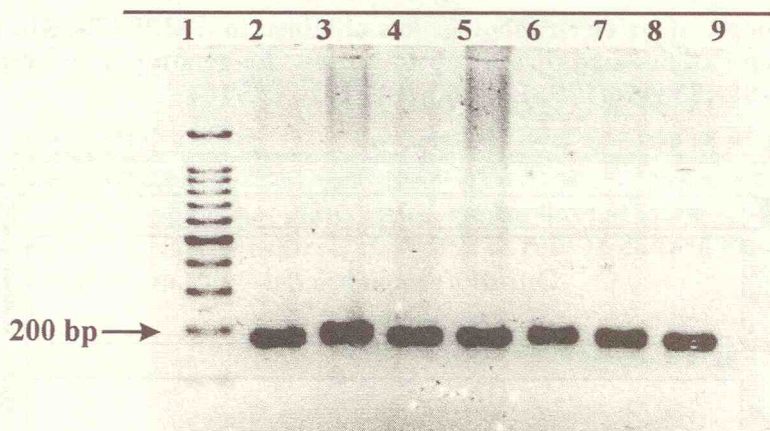
DNA Sequencing: In order to search for possible differences between a homozygous 175 BON allele and homozygous 175 Holstein allele, the sequence of a segment (nucleotide positions 1697-2203, 3' UTR) of one (175/175) animal belonging to each breed was determined. The sequence reactions were done with the DNA sequencing kit Big Dye terminator (PerkinElmer, Foster City, CA), following the manufacturer's recommendations for template and primer concentrations and cycling conditions. The products were resolved in a genetic analyzer ABIPRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA), analyzed with the navigator software.

Analysis of population genetic structure: In order to assess the allele neutrality and population independence, two Wright's Statistics (Fis, Fit), and the GENEPOP software were used.

Results:

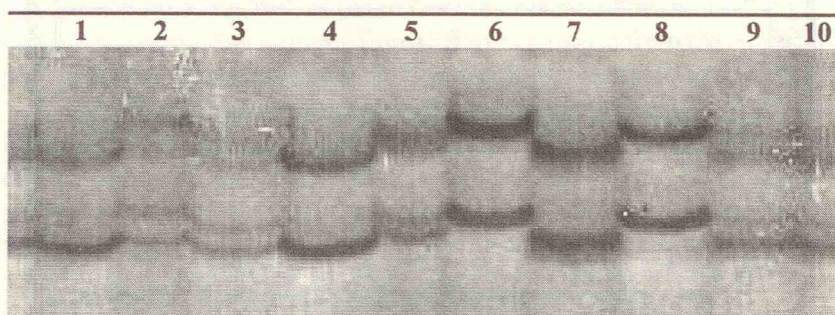
Although some PCR products exhibited slightly different sizes the exact size was not resolved with the 2% agarose gel (Fig1).

Fig 1. Electrophoresis in 2% agarose gel of 8 PCR products. Line 1 a 100 bp ladder. The lines correspond to samples of: 2,3: BON; 4,5: Holstein; 6,7,8: Brahman and 9: negative control.



The detected electrophoretic SSCP patterns in the three analyzed breeds are shown in Fig 2. All the Holstein and all but one BON had the 175/175 pattern. 20 of 76 Brahman also had 175.

Fig 2. SSCP patterns found in the three studied breeds. Line 1, control (175/175). Line 4 belong to BON and line 7 to Holstein, both patterns are identical among them and to the control. The other patterns are different to the control 175 and were found in several Brahman and in one BON.



In Figure 3 some electrophotograms obtained with the ABIPRISM 310 are shown; the picks correspond to different allele sizes. In table II the results of genotyping can be seen. It was confirmed that the SSCP pattern really has a 175 allele in a homozygous condition. The BON animal with a different pattern corresponded to 175 / 183 genotype. In the Brahman samples not having 175, five different size alleles (177, 179, 181, 183, 185) were found. In this breed three homozygous genotypes were detected: 175/175, 177/177, 181/181 with a frequency of 0.263, 0.039, 0.119, respectively; 0.579 of Brahman animals were in heterozygous conditions, from which 0.704 shared 175 allele. Additionally in the Brahman breed there were two alleles (183, 185) not previously reported.

Fig 3. Example of six electrophotograms obtained in ABIPRISM 310 in order to determine alleles size. From top to bottom the genotypes correspond to: 177/181, 181/183, 175/175, 175/183, 181/181, 175/181.

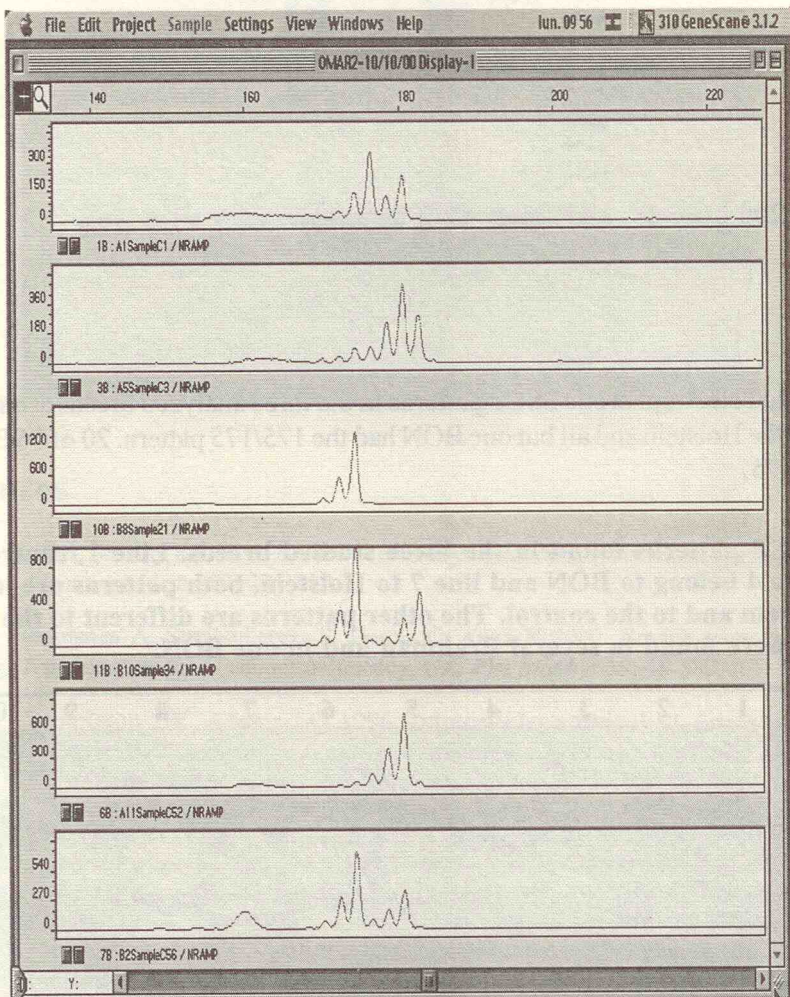


Table II. Genotypic Frequencies

Genotype	BON	Holstein	Brahman
175/175	0.986	1.00	0.263
175/177	0.000	0.000	0.039
175/179	0.000	0.000	0.013
175/181	0.000	0.000	0.329
175/183	0.014	0.000	0.013
175/185	0.000	0.000	0.013
177/181	0.000	0.000	0.145
181/183	0.000	0.000	0.026
181/181	0.000	0.000	0.119
177/177	0.000	0.000	0.040

With respect to allelic frequencies the most prevalent was 175 in all the breeds. In BON and Holstein this allele is fixed and in Brahman the frequency was near 50%. The 179 and 185 alleles were the less prevalent (Table 3).

Table III. Allelic Frequencies

Alleles	BON	Holstein	Brahman
175	0.993	1.00	0.467
177	0.000	0.000	0.132
179	0.000	0.000	0.007
181	0.000	0.000	0.368
183	0.007	0.000	0.019
185	0.000	0.000	0.007

Since in BON and Holstein there was no genetic variability the Fis value was calculated only for Brahman to test for Hardy-Weinberg (H&W) equilibrium. The Fis value in Brahman was 0.085 and the P value for heterozygous deficit was 0.0942; this means that this population is in H&W equilibrium, for the 3' UTR- STR locus.

Discussion

We found a good correlation between the SSCP pattern and the allele size obtained by ABI-PRISM, so that those samples with similar SSCP patterns have the same genotype while those samples with different SSCP patterns exhibit different genotypes. Therefore the SSCP is appropriate to determine variability in the 3' UTR- STR of the Nramp gene.

The finding of the 175 allele fixed in both BON and Holstein makes us to think that this phenomenon is the effect of selection, i.e. it is associated to some kind of resistance to intracellular infectious agent/s, since polymorphism in 3'-UTR of Nramp have been associated with mRNA stability in other species including humans (Bellamy et al 1998). Additionally, a preliminary study has found association ($P=0.0089$) (Feng et al, 1996) of the 175 allele (Adams et al, personal communication) with phenotypic resistance to *Brucella abortus* infection as determined *in vivo* (Templeton and Adams, 1990) and *in vitro* (Price et al, 1990; Qureshi et al, 1996).

Since the results of identical genotype for BON and Holstein were somehow against our intuition that BON shall be more resistant than Holstein we tested for the possibility that the up and downstream regions off 1908(GC)₁₃1934 3'-UTR Nramp locus the object of this work, could be different for these breeds. But mainly we wanted to emphasize the 1781(GC)₁₂1804 3'-UTR Nramp locus where Horin et al had found a complex polymorphism pattern in cattle. This would eventually tell us if in spite of these breeds having the same size STR allele they would have polymorphism outside the target locus, in which case the supposed resistance of BON could be explained by a hitchhiking phenomenon. As can be seen in Figs 4 and 5 no difference was found either with the SSCP technique for the whole 3' UTR or with the sequencing procedure in the downstream region.

Fig 4. DNA Sequencing. BON and Holstein sequences were compared with the original sequence reported by Feng et al, among positions 2150- 1951 (3' UTR-Nramp gene) no differences were detected in the two studied breed.

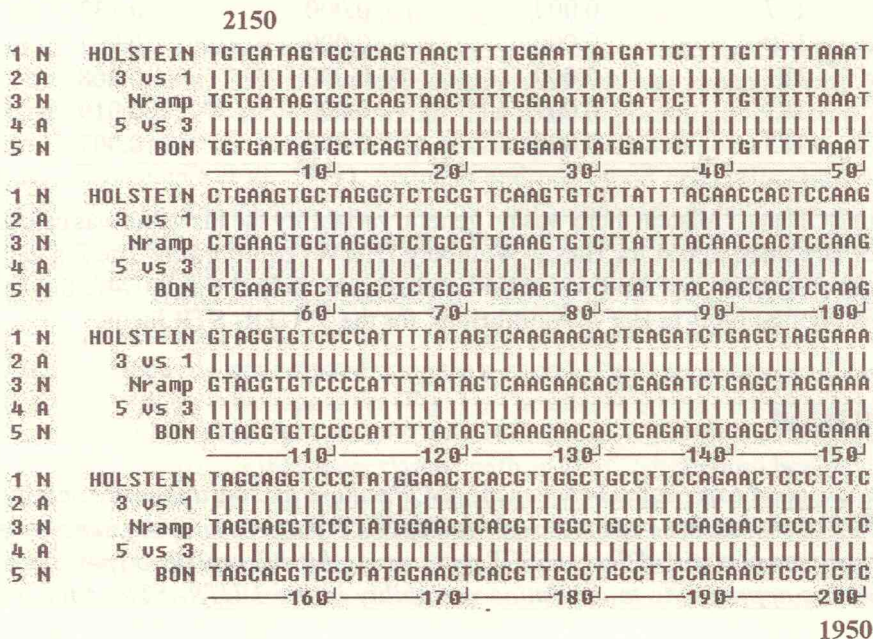
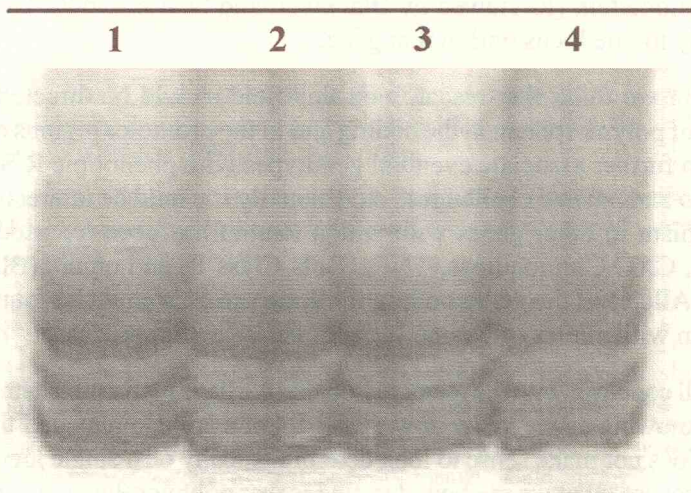


Fig 5. SSCP patterns of the complet 3 UTR found in BON and Holstein breed. No different patterns were detected in the two breeds. Lines 1 and 3: Holstein samples, lines 2 and 4, 175/175 BON samples.



The finding of identity up and downstream of 175 in both BON and in Holstein strongly suggest that this allele would not explain the supposed higher level of resistance in the autochthonous breed to intracellular parasites such as brucella.

The monomorphism found in the BON and Holstein breeds for the locus 1908STR1934 3'-UTR Nramp is very intriguing and deserves an explanation: One scenario is that due to inbreeding or/and genetic drift as an effect of husbandry practices; but this idea it is not in full agreement with the results of Carvajal et al, 1998, whose work with five microsatellite markers in BON indicate that heterocigosity in this cattle population was very high (0.672), interestingly in their study they also reported a H&W disequilibrium (P= 0.0006). This last finding does agree with our results.

A second scenario refers to the possibility that the fixation of the allele 175 in both breeds is due to positive selection for it given its association to resistance to intracellular pathogens. However, the results in Brahman where other five alleles were found, notwithstanding the higher frequency of 175 (0.467), this Brahman population was H&W equilibrium (Fis=-0.085 and P= 0.0942) for the allelic frequencies of the 1908STR1934 locus. This mean that the polymorphism in the studied locus in Brahman and perhaps in cattle in general is neutral. The last possibility is that the allele 175 is ancestral since it was monomorphic in BON and Holstein (both of them *B. taurus*) and has the highest frequency in Brahman (*B. indicus*). Therefore this allele may have been present since early on in *Bos primigenius*. If this is true, we have to conclude again that 175 is not associated with R/S.

It should be made clear however that our results do not indicate that the Nramp bovine gene is not involved in resistance/susceptibility to intracellular pathogens. It has been clearly demonstrated in mice that this gene has indeed a broad pleiotropic effect on macrophage activation pathways which tells of the complexity of the role of the gene in the R/S phenomenon (Reviewed by Blackwell and Searle, 1999). Our results are applicable only to one locus within that gene.

From this point we think that research on this field should be directed toward the identification of polymorphism in the coding and in the promotor regions of the bovine Nramp gene to further associate eventual genotypes with phenotypic R/S traits tested through *in vivo* and *in vitro* challenges. Additionally it would be interesting to search for polymorphism in other genes with which Nramp has been reported to interact, such as iNOS, CXC Chemoquines, TNF α , Bola Class II, and others (Blackwell and Searle, 1999) Alleles of the genes coding for these proteins could be found in linkage disequilibrium with alleles of Nramp by a natural selection process.

Finally we shall conclude with the major lesson that we have reaffirmed with the outcome of our work: knowing as we know now that R/S traits are complex and that Nramp is pleiotropic it does not make sense to look deterministically on a single locus within one single gene, because what we are bound to find is that polymorphism in a given locus is neutral, as we indeed found with the 1908STR1934 locus in the Nramp gene.

References

- Bellamy R, Rawende C, Corrah T, McAdam K.P.W.J., Whitte H.C. and Hill A.V. S. Variations in the Nramp1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *New England Journal of Medicine*, 338: 640.
- Blackwell J.M and Searle S. Genetic regulation of macrophage activation: understanding the function of Nramp1 (=Ity / Lsh / Bcg). *Immunology Letters*. 1999, 65: 73-80.
- Carvajal L.G, Bermúdez N.R, Moreno L.F, Márquez M.E, Estrada J.L, Davies S, Derr J, Bedoya G, Ossa J.E and Ruiz A. Genetic diversity of colombian criollo cattle. *Animal Genetics*. 1998. 29(1).
- Cellier M, Prive G, Belouchi A, Kwan T, Rodríguez V, Chias W and Gros P. Nramp1 defines a family of membrane proteins. *PNAS*. 1995, 92:10089-10093.
- Feng J, Li y, Hashad M, Schurr E, Gros P, Adams L.G and Templeton J. W. Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (Nramp1) gene. *Genome Research*. 1996, 6: 956.
- Horin P, Rychlik L, Templeton J.W and Adams L.G. A complex pattern of microsatellite polymorphism within the bovine Nramp1 gene. *European Journal of Immunogenetics*. 1999, 26: 311-313.
- Hu J, Bumstead N, Barrow P, Sebastiani G, Olien L, Morgan K and Malo D. Resistance to salmonellosis in the chicken is linked to Nramp1 and TNC. *Genome Research*. 1997, 7: 693-704.

Kuhn D.E, Baker B.D, Lafuse W.P and Zwilling B.S. Differential iron transport into phagosomes isolated from the RAW264.7 macrophage cell lines transfected with Nramp1^{Gly169} or Nramp1^{Asp169}. J. Leukoc. Biol. 1999, 66: 113-119.

Liu J, Fujiwara M, Buu N.T, Sanchez F.O, Cellier M, Paradis A.J, Frappier D, Skamene E, Gros P, Morgan K and Schurr E. Identification of polymorphisms and sequence variants in the human homologue of the mouse natural resistance-associated macrophage protein gene. Am. J. Hum. Genet. 1995, 56 :001-009

Machugh D.E, Shri8ver M.D, Loftus R.T, Cunningham P and Bradley D.G. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle. (Bos taurus and Bos indicus). Genetics. 1997, 146: 1071-1086.

Martínez G. The Colombian Criollo Cattle Breeds. In: Proceedings of the third global conference on conservation of domestic animal genetic resources. Rare breeds international; Queens University, Kignston, Ontario-Canada. 1995; 161-166.

Mathews G. D and Crawford A.M. Cloning, sequencing and linkage mapping of the Nramp1 gene of sheep and deer. Animal Genetics. 1998, 29,1.

Orita M, Suzuki Y, Seliya T and Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics. 1989, 5: 874-879.

Sambrook J, Fritsch E.F, Maniatis T, editors, Isolation of high-molecular –weight DNA from mammalian cells. In: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989, p. 9.14-9.23.

Price R.E, Templeton J.W, Smith III R and Adams L.G. Ability of Mononuclear phagocytes from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis to control *in vitro* intracellular survival of *Brucella abortus*. Infection and Immunity. 1990, 58(4):879-886.

Qureshi T, Templeton J.W and Adams L.G. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis*- BCG, *Salmonella dublin*, and *Salmonella typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. Vet. Immun. Immunopat. 1996, 50: 55-65.

Swilling B.S, Kuhn D.E, Wikoff L, Brown D. and Lafuse W. Role of iron in Nramp 1- mediated inhibition of mycobacterial growth. Infection and Immunity. 1999, 67:3, 1386-1392.

Templeton J.W and Adams L.G. Natural resistance to brucellosis: in Advances in Brucellosis Research. Garry Adams ed., 1990: Cap 10.

Tuggle C.K, Schmitz C.B and Gingerich-Feil D. Cloning of a pig Full-length natural resistance associated macrophage protein (Nramp1) cDNA. J. Anim. Sci. 1997, 75: 277.

Vidal S. M and Gross P. Resistance to infection with intracellular parasites: Identification of a candidate gene. NIPS. 1994, 9; 178-183.

Vidal S. M, Malo D, Vogán K, Skamene E. and Gros P. Natural Resistance to infection with intracellular parasites: Isolation of a candidate candidate for BCG. Cell. 1993, 73: 469-485.

Vidal S. M, Tremblay M.L, Govoni G, Gauthier S, Sebastiani G, Malo D, Skamene E, Oliver M, Jothy S and Gros P. The Ity/Lsh/Bcg locus: Natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the of the Nramp1 gene. J. Exp. Med. 1995, 182: 655-666.

Vidal S.M, Pinner E, Lepage P, Gauthier S. and Gros P. Natural resistance to intracellular infections. The Journal of Immunology. 1996, 157: 3559-3568.

Standardization of bovine macrophage monolayers and isolation and culture of trypanosomes *

Omar A. Saldarriaga, Jaime I. Velásquez*, Jorge E. Ossa, María T. Rugeles

Grupo de Inmunovirología-BIOGENESIS, Facultad de Medicina * Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad de Antioquia

Abstract

We describe a method for culturing over 90% pure bovine macrophages from peripheral blood mononuclear cells separated with Nycoprep. The cells were cultured for 12 days and then stained with esterase and with anti CD14 to test for purity. The method is reproducible and ensures an adequate number of cells for immunological research. Additionally, we report the unexpected finding of Trypanosome trypomastigotes in our macrophage cultures from bovines belonging to a geographic area from which no bovine trypanosomes had been reported before.

Key words: macrophages – bovine - trypanosomes

Macrophages represent an ubiquitously distributed population of fixed and circulating mononuclear phagocytes that, at least in higher organisms, express a variety of functions other than phagocytosis, including cytokine production, killing of microbes and tumor cells and processing and presentation of antigens to lymphocytes (Qureshi et al. 1996, Cerone et al. 2000). Macrophages exhibit functional, morphological and metabolic diversity depending on the site of origin and on the stage of differentiation or activation. We are interested in studying the phenomenon of natural resistance against *Brucella*/*Salmonella* associated with “natural resistance associated macrophage protein” (Nramp1). For this reason and with the aim of in vitro phenotyping cattle for resistance/susceptibility to *B. abortus*/*S. dublin* we modified some protocols to come up with a

* Artículo publicado originalmente en: *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*. Vol. 98: 2, pág. 269-271 / 2003

method for macrophage culturing that we find very efficient. Since mature tissue macrophages are not readily available for functional analysis and taking into consideration the key role that these cells play in the immune response, the alternative of using in vitro monocytes-derived macrophages for functional studies is very attractive. Additionally, we report the finding, for the first time in our geographic area (state of Antioquia) of Trypanosome trypomastigotes appearing in the cultures extracellularly, at around 11 days and growing in density until practically destroying the cell monolayer. The promastigote form was never detected.

The detailed procedure is as follows: 300 ml of blood were collected from the jugular vein, from each animal, into Citrate Fosfate Dextrose and Adenine (CPDA) anticoagulant containing bags (Baxter, Mexico). The sample was then centrifuged at 1000 x g for 25 min. The buffy coat was resuspended in 4 ml of citrate phosphate buffered saline (PBS-citrate) (pH 7.3) and then overlaid on 3 ml of a Nyco-prep solution (density = 1077; NYCOMED PHARMA AS, Oslo, Norway) and centrifuged at 1000 x g for 25 min. Mononuclear cells were collected and washed twice with PBS-citrate and resuspended to a concentration of $6-15 \times 10^6$ cell/ml⁻¹ in RPMI-1640 medium (SIGMA, Chemical Co., St. Louis, MO) supplemented with 7% inactivated and filtered autologous serum, 2 mM L-Glutamine (SIGMA), 10 mM sodium piruvate (SIGMA) and 1% MEM Non-Essential Amino Acid Solution (100x) (SIGMA); antibiotics were not used. One milliliter of the cell suspension was added to each well of a 24 flat bottom plate (NUNC, Naperville, Illinois) and placed at 37°C/5% CO₂ (Heraeus Instruments, Hanau, Germany). Twenty four hours later the monolayer was washed twice with pre-warmed (37°C) PBS and 75% of the medium was replaced with RPMI supplemented with 10% autologous serum. At this point, the majority of cells, around 75%, are adherent monocytes that look large and round. On day 8 the monolayer was washed and the non-adherent cells, mostly B-lymphocytes, as tested by flow cytometry, were removed. Again, 75% of the cell culture medium was replaced with RPMI supplemented with 10% autologous serum. The most important point to consider in culturing macrophages is the possibility of contamination with other cells such as lymphocytes (Bennett et al. 1992), platelets and red blood cells. However, in our conditions we found that maintaining the culture with contaminant cells, without much manipulation until the second wash (day 8 of culturing) was a more efficient strategy. At this time the non-adherent cells, forming an overlay like film could be easily removed by gently pipetting. The culture medium was replaced every 3 to 5 days and at day 11 the monolayer exhibited 95% confluence, mainly as a result of cell spreading. At this time the esterase activity was detected using the a-naphthyl acetate esterase kit (SIGMA) to find that 95 % of cells were positive (Fig. 1). The attached cells could be recovered using cold PBS/10 min and then scraped with cell scrapers. In order to determine the purity of the removed cells they were stained with an FITC labeled anti bovine CD14, Mab (M-M8) (VMRD, Inc. Pullman, WA) and analyzed under flow cytometry. 94.7% of the cells were positive (Fig. 2). This protocol ensures the recovery of macrophages that can be used in different assays, such as phagocytosis. The addition of autologous serum to the cultures guarantees the presence of growth factors to support the differentiation of monocytes.

Fig 1: 95% esterase activity of bovine macrophage monolayer after 11 days of culture.

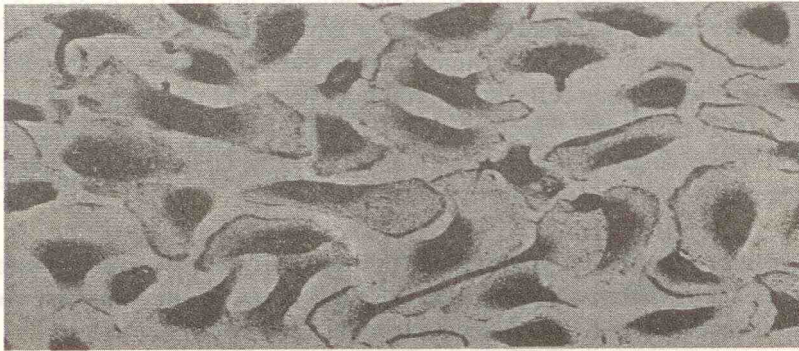
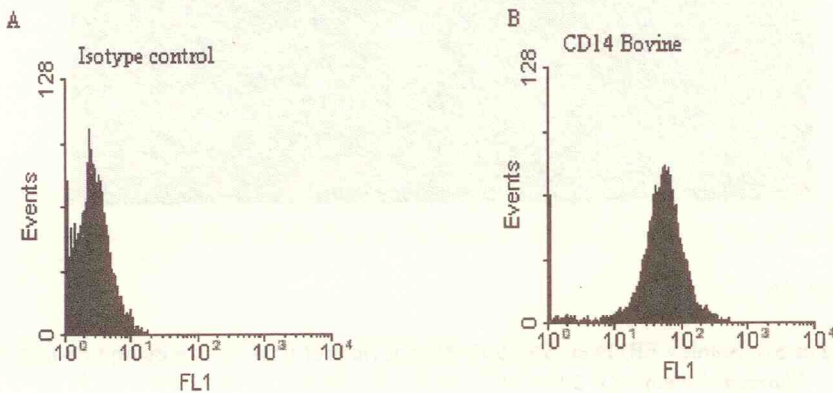


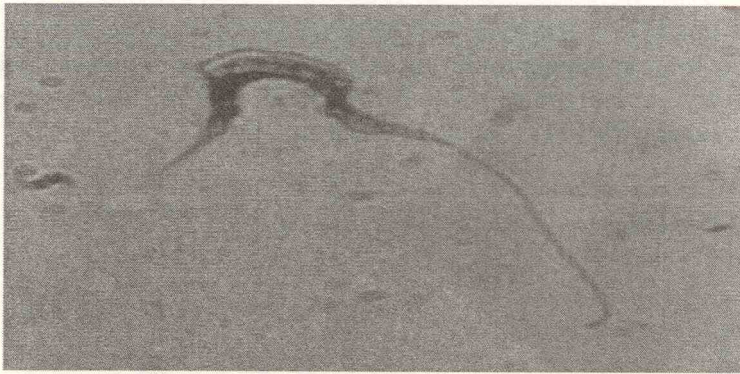
Fig 2: bovine macrophage population after twelve days of culture, analyzed by flow cytometry. A: isotype control; B: 94.7% of cells in culture express CD14 marker, revealed with FITC-labeled mouse anti-IgG.



After 11 days of culture we detected an unusual protozoa contamination of the macrophage cultures (Fig. 3). The parasites were observed swimming freely and the observation was repeated in cultures from different animals from the same farm, along a sampling period of 6 months in which 17 animals were studied and 11 (64.7%) were found infected. The trypanosomes survived and replicated only if the medium was replaced every 3-5 days. The macrophage monolayers degenerated if the parasites were not removed. Additionally, infected monolayers altered phagocytosis assays, perhaps due to preactivation of the macrophages induced by the parasites. The morphological analysis, the inability to detect the parasites in blood smears, the good health conditions of the animals and the imminent presence of the vector (*Tabanus*) suggest infection by *T. theileri*. These findings are concordant with Verloo et al. (2000)

who found that this trypanosome can actively grow in bovine mononuclear cells cultured in RPMI 1640 medium. Additionally, our observations are in agreement with Ventura et al. (1996) who convincingly state that these parasites are rarely found in peripheral blood smears. It would be interesting to determine what is (are) the particular condition(s) allowing the proliferation of trypomastigotes under these *in vitro* conditions: it could be the absence of other immune cells like T lymphocytes or the production of monocyte/macrophage derived factors which could eventually be used by the parasite for its proliferation. Disentangling these interactions may be crucial for further understanding the pathogenesis of trypanosomiasis.

Fig 3: Photomicrograph of trypomastigotes found in blood-derived mononuclear cell cultures from different naturally infected cows, from San José del Nus, Antioquia, morphometrically characterized as *Trypanosome theileri*.



References

- Bennett S, Por SB, Stanley ER, Breit SN 1992. Monocyte proliferation in a cytokine-free, serum free system. *J Immunol Meth* 153: 201-212.
- Cerone S, Sansinanea A, Streitenberger S, Garcia C, Auza N 2000. Bovine monocyte-derived macrophage function in induced copper deficiency. *Gen Phy Biophys* 19: 49-58.
- Qureshi T, Templeton JW, Adams LG 1996. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella dublin*, and *Salmonella typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. *Vet Immunol Immunopathol* 50: 55-65.
- Ventura RM, Rodríguez AC, Dell' Porto A, Campaner M, Takeda G, Teixeira MM 1996. Molecular tools for the identification and characterization of *Trypanosome (Megatrypanum)* spp. and *Trypanosome (Trypanozoon) evansi*. En: <http://memorias.ioc.fiocruz.br/96caxambu/rt1.html>.
- Verloo D, Brandt J, Meirvenne NV, Buscher P 2000. Comparative in vitro isolation of *Trypanosoma theileri* from cattle in Belgium. *Vet Parasitol* 89: 129-132.