

Evaluación del tratamiento de semen bovino con anticuerpos específicos contra la rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB) Ensayos preliminares

RODAS JD MV.MS.*, ARBOLEDA JJ MV.MS.*, ZULUAGA FN MV.MS.*,
TRUJILLO LE MV. ESPEC. REPR.*, HENAO G MV. EST. MAEST. REPR.*,
GUTIÉRREZ N MV.**, CHAVERRA LD MV.**, OSSA JE MV. PhD.*

Resumen

El líquido preseminal de los toros seropositivos puede estar contaminado con el HVB-1, constituyendo un serio riesgo de infección a través de la monta natural o de la inseminación artificial. Con la intención de "curar" el semen de estos toros, que legalmente no pueden ser usados en programas de reproducción, se evaluó la efectividad de un tratamiento con anticuerpos específicos contra el HVB-1 en semen contaminado experimentalmente.

Se intentó producir anticuerpos específicos anti-HVB-1 en yemas de huevos de gallinas, teniendo en cuenta la utilización regular de la yema en la criopreservación del semen.

Para determinar la concentración de anticuerpos en suero aviar y en extracto de inmunoglobulinas de yema se emplearon las técnicas de neutralización viral y un ELISA competitivo.

No fué posible encontrar respuesta de anticuerpos en las aves, a pesar de usar diferentes líneas comerciales y diferentes vías y protocolos de inoculación.

Alternativamente, se utilizó un suero sanguíneo bovino con un título de anticuerpos neutralizantes de 32, para controlar "in vitro" el efecto citopático del HVB-1 sobre células MDBK previamente inoculadas con muestras de semen contaminadas experimentalmente. Dicho suero diluido al 10% fue capaz de neutralizar completamente 6.⁴ Dosis Infecciosa Cultivo de Células 50 (DICC50) y parcialmente 64DICC.

Nuestros esfuerzos están dirigidos muy particularmente al desarrollo de posibilidades biotecnológicas para tratar de salvar el potencial genético de toros seropositivos de razas criollas como el ganado Blanco Orejinegro (BON), que se encuentran en peligro de extinción.

Introducción

El HVB-1 es un patógeno de gran importancia económica en la industria bovina, asociado a una variedad de síndromes clínicos principalmente de tipo respiratorio y genital, pero también con un marcado neurotropismo que se expresa mayormente en terneros (4,11). La forma respiratoria solo fué reconocida en los Estados Unidos a mediados de la década de los 50 y en

esta misma época se aisló el agente; sin embargo, la forma genital había sido descrita desde mediados del siglo XIX, en Europa (14).

Las formas respiratoria y genital pueden presentarse por separado o conjuntamente, aunque la primera posibilidad es la más frecuente. La vulvovaginitis y la balanopostitis son los signos más asociados con la forma genital. La vulvovaginitis se

* Programa de Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, AA 1226

** Fac. de Med. Veterinaria y de Zootecnia, Universidad de Antioquia, AA 1226. Medellín, Colombia.

Investigación financiada por Colciencias y la Universidad de Antioquia

considera una forma benigna, que no cursa con abortos y es también conocida como vulvovaginitis venérea o exantema coital. Clínicamente se observan zonas rojo-oscuro en la mucosa vulvar que se transforman en pústulas blancas focales que al romperse dejan superficies sangrantes (4,11). La infección respiratoria puede conducir al aborto, especialmente entre el cuarto y el séptimo mes de gestación y se asocia igualmente con el nacimiento de terneros débiles y con anejros prolongados (4). En los toros la balanopostitis produce lesiones similares a las descritas anteriormente, pero en casos graves se pueden presentar adherencias severas y fimosis (14).

Como todos los herpes, el HVB-1 permanece latente durante toda la vida de los animales infectados, en las raíces dorsales de los ganglios nerviosos sensoriales (14,15), de donde puede reactivarse ante estímulos asociados con estrés e inmunodepresión, tales como tratamiento con dexametasona, estación de monta e infecciones concomitantes con otros virus y con bacterias como *Pasteurella* (4,11,14,15). Los mecanismos de la reactivación y de la latencia misma no han sido bien caracterizados. Una de las vías de excreción viral que han sido documentadas es el semen, si bien el impacto epidemiológico de esta vía no es muy claro. Desde el punto de vista teórico, las consecuencias podrían ser devastadoras, sobretodo en condiciones de monta natural; si bien el virus también puede llegar en condiciones infectantes a través de la inseminación artificial (14,15). Para controlar la diseminación de la infección, en muchos países, incluido Colombia, existe legislación que prohíbe la congelación de semen de toros seropositivos (3).

En el Programa de Reproducción de la Universidad de Antioquia estamos particularmente interesados en las razas de bovino criollo colombiano y particularmente en el Blanco Orejinegro (BON), con el objetivo final de caracterizar y preservar su potencial genético, ante la inminente amenaza de extinción. Encuestas serológicas preliminares de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB) han demostrado que la mayoría de los machos de esta raza en servicio, al momento de la encuesta, eran seropositivos (Ver 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 y consecuentemente se encuentran "*legalmente*" imposibilitados, para reproducirse(3); esta circunstancia representa un cuello de botella adicional para esta raza que perdería de esta manera su ya escasa diversidad.

Por lo tanto es pertinente tratar, a toda costa, de recuperar el potencial genético descrito y a la vez crear conciencia de que estas razas pueden representar uno de los puntos claves en el futuro de la ganadería colombiana, gracias al proceso de selección natural que ha operado sobre ellas a lo largo de 500 años de sobrevivencia en la geografía del país (1).

Por las anteriores razones y basados en la premisa de que el virus no infecta al espermatozoide mismo, sino que se encuentra contaminando el fluido seminal(5), se decidió probar la hipótesis de que es posible "*curar*" el semen bovino infectado, con anticuerpos específicos para RIB, sin que se pierda la calidad fecundante del semen. Una fuente inmediata de tales anticuerpos es el suero bovino obtenido de animales infectados en forma natural y otra posibilidad es la de producir esos anticuerpos mediante inoculación en gallinas, cuyos huevos que en forma natural concentran los anticuerpos en la yema, son utilizados rutinariamente como agente crioprotector en la congelación el semen bovino (6). Con base en estos principios, resulta lógico proponer esta estrategia biotecnológica como una posibilidad teórica y práctica para el control de la infección, en condiciones de inseminación artificial.

Materiales y Métodos

Virus y células: se utilizó un HVB-1 suministrado por la Universidad de Wisconsin, que se cultivó en células Madin-Darvy Bovine Kidney (MDBK) obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC 22).

Inmunización de aves: para la producción de anticuerpos en yemas de huevo se realizaron tres experimentos con gallinas de tres líneas genéticas diferentes (Lhoman Selected Leghorn/liviana, Dekalb Gold/semipesada y Hy Line W/36/liviana).

En el primer ensayo se procedió de la siguiente forma: se emplearon grupos de aves ponedoras livianas de la línea Lhoman Selected Leghorn (LSL) de 20 semanas de edad distribuidas en tres subgrupos de 2 animales cada uno. El primer subgrupo fué inoculado con una emulsión que contenía 106 DI del HVB-1 en adjuvante completo de Freund; cada ave recibió 1 ml en la semana 6 de producción, por vía subcutánea y un refuerzo con la misma dosis del virus, sin adyuvante, en las semanas 7,9, 11 y 13, por la misma vía. Los controles recibieron 0.5cc del diluyente viral más 0.5cc del adjuvante de Freund en la semana 6 y diluyente viral en las semanas subsiguientes.

Un tercer grupo fué inoculado con 0.5cc de semen bovino más 0.5cc de adjuvante completo de Freund, con el fin de contar con inmunoglobulinas anti-espermatozoides para corroborar, posteriormente, posibles reacciones cruzadas de anticuerpos dirigidos contra las proteínas de las células MDBK, en las cuales se replica el virus inoculado, que afectaran la movilidad o la la viabilidad de los espermatozoides a tratar.

Una semana después de la segunda inoculación y una semana después de cada una de las inoculaciones subsiguientes, las aves fueron sangradas para determinar la presencia de los anticuerpos esperados. Igualmente se colectaron los huevos producidos durante el mismo período y se siguieron varios protocolos para extracción de inmunoglobulinas (Igs) a partir de lotes de huevos de cada grupo de aves (8,9,16).

En el segundo experimento se utilizó el mismo protocolo en la línea Dekalb Gold y en el tercero se ensayó la línea Hi Line y la vía intramuscular.

Anticuerpos y pruebas serológicas: Se determinó la presencia de anticuerpos en sueros sanguíneos de bovinos y de aves, y en extractos de yemas. Para el efecto se utilizaron pruebas de neutralización, ELISA y ELISA competitivo. La neutralización se realizó acorde con protocolos internacionales (2) y el ELISA con suero bovino se realizó de acuerdo con protocolos estandarizados por nuestro grupo (Ver 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). El ELISA competitivo se diseñó ante la falta de un conjugado para detectar inmunoglobulinas aviares, con el objeto de demostrar la presencia de anticuerpos específicos contra el virus. Esta prueba se practicó en suero sanguíneo y en yemas de huevo y se utilizaron los mismos elementos del ELISA para bovinos, es decir, con anticuerpos contra IgG bovina conjugados con fosfatasa alcalina, excepto que, luego de agregar los diferentes sueros o extractos de Igs de yema aviares, se agregó un suero bovino positivo de referencia en todos los pozos, y la reacción se midió por la reducción en los valores de densidad óptica, con relación a los controles.

Muestras de semen: Para los diferentes ensayos de detección viral en muestras de semen fresco se utilizaron especímenes obtenidos a partir toros seronegativos de la granja "San Pablo" de la Universidad Nacional (Seccional Medellín).

Pruebas *in vitro* de tratamiento de semen experimentalmente contaminado: antes de realizar los ensayos con anticuerpos se verificó la inocuidad que sobre el semen pudiera tener el suero bovino inactivado, utilizado como fuente de los mismos. Se tomó semen de probada fertilidad y se sometió a diferentes concentraciones de suero con un título de anticuerpos neutralizantes de 32. Posteriormente, para probar la capacidad neutralizante de los anticuerpos, incorporados en el diluyente del semen, se utilizó el siguiente protocolo:

Se mezcló semen experimentalmente contaminado con HVB-1 con suero bovino en diluciones al 5 y al 10% y se incubó a 37°C/30' y luego se inoculó sobre células MDBK en platos de 24 pozos.

El semen había sido contaminado con el HVB-1 en diluciones de 10^{-1} a 10^{-5} equivalentes a 10.000 - 1 Dosis Infecciosas respectivamente ($DICC_{50}$). Luego el plato fué incubado durante 72h a 37°C/5% CO_2 y finalmente coloreado con cristal violeta y evaluado.

Resultados

Respuesta inmune de las aves a la inoculación con el HVB-1: No se detectaron anticuerpos neutralizantes en los sueros sanguíneos ni en los extractos de yema de ninguna de las gallinas inoculadas con el HVB-1.

Pruebas *in vitro* de tratamiento de semen experimentalmente contaminado: inicialmente las diluciones del virus se practicaron en semen completo, pero la toxicidad de la muestra sobre células MDBK no permitió la observación adecuada del Efecto Citopatogénico (ECP) viral; por lo tanto fué necesario hacer diluciones dobles del semen en busca de una dilución no citotóxica. Esta dilución resultó ser 1:64.

Luego se practicaron diluciones del virus en semen completo desde 1:10 hasta 1:1000 que contenían, de acuerdo con el título viral previamente establecido (10^5), entre 10.000 y 100 $DICC_{50}$ respectivamente. A continuación cada una de estas diluciones fué a su vez diluida 64 veces para observar el ECP; así las diluciones virales finales estuvieron entre 1:640 y 1:64000 correspondientes a $DICC_{50}$ entre 640 y 6.4. Posteriormente las muestras de semen experimentalmente contaminadas fueron tratadas con anticuerpos de acuerdo con el protocolo ya descrito en materiales y métodos.

En primer lugar se demostró que el virus, diluido en semen, en la forma indicada es detectable por su efecto citopático hasta la menor dilución ensayada, correspondiente a 6.4 $DICC_{50}$.

Los resultados de la prueba modificada fueron los siguientes:

El tratamiento de las muestras experimentalmente contaminadas, con suero bovino al 5% no tuvo efecto protector en ninguno de los casos.

En los pozos inoculados con semen infectado y tratados con suero al 10%, el efecto neutralizante fue manifiesto en la dilución correspondiente a 64 $DICC_{50}$ pero la protección no superó el 30%, siembargo en los pozos con 6.4 $DICC_{50}$ la neutralización fué total.

Discusión

A pesar de que el modelo de producción de anticuerpos en aves y su transferencia a la yema de huevo ha sido probado con éxito utilizando varios tipos de antígenos (8,9,10,12,13,16) los múltiples esfuerzos encaminados a su utilización en este ensayo con HVB-1 resultaron infructuosos. La primera explicación al fenómeno podría ser la falta de reconocimiento de las proteínas de este virus, por parte de las líneas genéticas aviares utilizadas en el experimento, debido a, una carencia del complejo mayor de histocompatibilidad para presentar dichos péptidos virales; es decir, podría tratarse de una restricción genética o restricción de especie o ambas.

El tratamiento alternativo con anticuerpos bovinos, en muestras de semen contaminado experimentalmente, de acuerdo con los resultados de los primeros estudios "*in vitro*" parece tener buenas posibilidades, pero será necesario estandarizar los protocolos para utilizar sueros con un alto título viral. Adicionalmente, se debe tener en cuenta que las muestras de semen a ser evaluadas deberán ser diluidas 64 veces para eliminar su citotoxicidad y verificar la efectividad del tratamiento; esta dilución es similar a la empleada por otros autores (7,15). El bovino suero podría utilizarse para realizar varios lavados del semen antes de la congelación y para ser incluido en el diluyente del semen antes de su congelación.

El anterior protocolo es, teóricamente, factible si consideramos que la infección viral no está asociada con los espermatozoides en el semen sino que esta asociada con el plasma seminal (5); por lo tanto es posible, en principio, "*lavar*" los espermatozoides y finalmente diluirlos en presencia de hasta un 10% del mismo suero neutralizante. La prueba final de la eficiencia del sistema será el nacimiento de terneros no infectados.

El anterior procedimiento sería de la mayor importancia cuando se trate de recuperar un potencial genético excepcionalmente valioso. Tal es el caso de nuestros ganados criollos colombianos que se encuentran en peligro de extinción sin que previamente hayamos definido las características genéticas de su

rusticidad y potencial productividad, particularmente en condiciones de mestizaje con razas foráneas especializadas.

Finalmente, si un procedimiento como el descrito

podiera demostrar su eficiencia, podría pensarse en su aplicación a situaciones similares relacionadas con otros agentes virales de transmisión venérea tales como la Diarrea Viral Bovina y la Lengua azul (4,11).

Summary

Evaluation of treatment of BHV-1 experimentally infected semen with specific antibodies (Preliminary Report)

Because BHV-1 can be shed semen of infected bulls natural mating and artificial insemination represent a serious risk for masively infecting bovine herds.

The focus of our attention in this report is the possibility of rescuing the genetic potencial of BON bulls. Much of the good quality semen whose breed is at risk extinction belongs to BHV-1 infected bulls. We reasoned that if the virus is extracellular in this fluid, it could be possible to Nt it with specific antibodies.

As hens yolk is routinely used for semen preservation, an attempt was made to produce BHV-1 antibodies in hens. To determine BHV-1 immunoglobulins in hen serum and egg yolk competitive ELISA and serum neutralization tests were performed.

It was not possible to detect an anti-BHV-1 antibody response in two breds of hens and with diferents inoculations protocols.

Alternatively, a bovine serum with a Nt title of 32 was used to treat experimentaly infected semen samples in conditions similar on for semen freezing. This treatment was able to completely neutralize 6.4 ID of the virus but only partially 64 ID.

Referencias

- Arboleda O. Ganado Criollo Blanco Orejinegro. Depertar Lechero 1993. No. 9 : 29-50.
- Deregt D, CHO H J and KOZUB G C. A comparative evaluation of two sensitive serum neutralitation test for bovine herpesvirus-1 antibodies. Can J Vet Res 1993;57:56-59.
- Estupiñan, J. Ruiz, A., Jiménez, J. y cols. División de Sanidad Animal. Colombia: Sanidad Animal. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Subgerencia de Producción Pecuaria. División de Salud Animal. Marzo 1978. p. 31
- Fenner F, Bachman P, Gibbs E, et al. Veterinary Virology Orlando: Academic Press, 1987. 660p.
- Guerin C, Harlay T, Guerin B, Thibier M. Distribution of fractions of semen from a naturelly infected bull. Theriogenology 1993; 40: 997-1002.
- Hafez E.S.E. Reproducción e inseminación artificial en animales. 4a ed. Ed interamericana. México. 1984. 599 p.
- Howell C L, Miller M J and Bruckner D A. Elimination of toxicity and enhanced Cytomegalovirus detection cell cultures inoculated with semen from patients with acquired Immunodeficiency Syndrome. Journal of Clinical Microbiology 1986;657-660.
- Jensenius J C, Andersen I, Hau J, et al. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. Journal of Immunological Methods 1981;46:63-68.
- Kokko H, Kuronen I, and Karenlampi S. Rapid production of antibodies in chicken and isolation from eggs. Cell Biology: A Laboratory Handbook 1994;282-288.
- Kuroki M, Ohta M, Ikemóri Y, et al. Passive protection against bovine rotavirus in calves by specific immunoglobulins from chicken egg yolk. Arch Virol 1994;138:143-148.
- Neira R. Rinotraqueitis Infecciosa bovina. Revista Acovez. 1986; Vol10 No.34: 23-26.
- Song C S, YU J H, BAI D H, et al. Antibodies to the alfa subunit of insulin receptor from eggs of immunized hens. The Journal of Immunology 1985;3354-3359.
- Thalley Bs And Caroll Sb. Rattlesnake and scorpion antivenoms from the yolks of immunized hens. Biotechnology Vol 8. 1990.
- Van Oirschot J, Straver J, Van Lieshout A, et al. A subclinical infection bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. Vet Record 1993; 132: 32-35.
- Weiblen R, Kreutz L.C, Canabarro T.F et al. Isolation of herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis. J. Vet. Diagn. Invest. 1992. No. 4: 341-343
- Yazawa S, Hosomi O, Takeya A. Isolation and characterization of anti-H antibody from egg yolk of immunized hens. Immunol Investigations 1991; 20(7):569-581.