

ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE LA INFECCIÓN POR MAEDI VISNA OVINO EN ANIMALES VACUNADOS POR VÍA MUCOSA MEDIANTE PCR, COCULTIVOS Y RESPUESTA HUMORAL

B. González, R. Reina, I. Glaria, M.I. Mora, I. García, D. de Andrés y B. Amorena

SIA (DGA) Ave. de Montañana 930, 50059 Zaragoza e Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales, CSIC-UPNA. Ctra. Mutilva Baja, 31192 Mutilva Baja, Navarra

INTRODUCCIÓN

El conocimiento sobre la dinámica de la infección por el lentivirus ovino Maedi Visna (VMV) y la inmunidad frente a él es limitado, pero se sabe que una menor replicación vírica en la fase aguda de la infección por lentivirus, detectable por PCR o cocultivos, está asociada a una menor progresión de la enfermedad (Ourmanov et al., 2000). Por otro lado, el efecto protector de los anticuerpos neutralizantes (AcNt) ha sido motivo de controversia, afectando más a los estadios tardíos que a los tempranos (Horton et al., 2002). Con altas dosis (10^5 - 10^6 TCID₅₀) en la infección experimental (i.e.) en individuos no inmunizados, se obtienen títulos elevados de AcNt frente a VMV (Bird et al., 1993; Andresdóttir et al., 2002), pero con bajas dosis (10^2 TCID₅₀), los AcNt aparecen en concentración muy baja y homogénea entre animales, mientras va aumentando la carga vírica (Cuisinier et al., 1997). En este caso, los AcNt no eliminan la infección y son indicio de replicación vírica y exposición de los antígenos virales al sistema inmune, indicio que debería confirmarse (por ejemplo, por PCR, cocultivos y ELISA).

Para comprender la dinámica de la infección y la inmunidad frente al VMV, se ha realizado en este trabajo un estudio longitudinal con distintas técnicas de detección de la infección por VMV (PCR, ELISA, carga vírica detectada mediante cocultivos, y producción de AcNt) en ovinos seronegativos de un rebaño con VMV, sometidos a un programa de inmunización-i.e. vía mucosas (González et al., 2002b).

MATERIAL Y MÉTODOS

Inmunización e infección experimental. Las inmunizaciones se realizaron en ovejas Rasa Aragonesa, con pistola de genes (González et al., 2001a) en mucosa vulvar a 300 psi de helio, administrándose por animal 5 µg de pcDNA-*env* (1 µg de ADN/disparo). El grupo control recibió 5 µg de pcDNA-*lacZ* en lugar de pcDNA-*env*. Un mes después, las ovejas vacunadas recibieron 3 disparos de 1 µg de pcDNA-*env* y 2 de 1 µg de pCR3.1-*IFN-γ*, cada uno. Los animales del grupo control recibieron 3 disparos de 1 µg de pcDNA-*lacZ* y 2 de 1 µg de pCR3.1-*IFN-γ*. Tras 2 semanas, se realizó la infección experimental (i.e.), con 1000 TCID₅₀ (dosis infectiva que produce el 50% de pocillos con efecto citopático por cada 10^6 PBMC) de la estirpe EV1 (la usada para generar *env*), por vía intratraqueal según González et al. (2001b).

Aislamiento de células y obtención de ADN. Se utilizó sangre para aislar células mononucleadas (PBMC) por flotación (Ficoll-Hypaque, d=1,077; Lymphoprep Asix-Shield, Oslo), obteniéndose el ADN por el sistema QIAamp DNA Blood Midi Kit (QIAGEN GmbH. Hilden, Germany).

Detección de la carga vírica por cocultivos, presencia vírica por PCR y AcNt. Tras realizar cocultivos de los PBMC de las ovejas estudiadas con células diana (fibroblastos) de oveja libre de VMV (Bird et al., 1993), se midió la carga vírica (TCID₅₀). La presencia de VMV se detectó en ADN de PBMC por PCR de la región

Pol (C.Woodall, Universidad de Edimburgo, comunicación personal; Tolari et al., 2000) siguiendo una metodología semianidada puesta a punto en nuestro grupo. El título de AcNt se determinó según González et al. (1999).

RESULTADOS Y DISCUSION

Antes de la infección experimental ninguno de los animales mostró evidencia de infección por PCR o ELISA al inicio del estudio, pero tras la primera inmunización (2 semanas antes de la i.e.; Tabla 1), 2 animales del grupo inmunizado y otros 2 del grupo control fueron positivos en PCR mientras que en ELISA permanecían negativos. La secuencia del DNA vírico de la oveja 7331, obtenida en este período, correspondía a una estirpe de campo (WT3). En general la PCR fue más sensible que el ELISA para detectar la infección. De hecho, el ELISA fue negativo desde antes de la i.e. y hasta 60 días post i.e.. Quizá la baja presencia vírica, antes de la i.e. (nula al inicio) y tras la i.e. (dosis 10^3 TCID₅₀), condujo a bajos títulos de anticuerpos, dificultando su detección por ELISA.

. En los 4 primeros días tras la i.e., el grupo inmunizado no presentó carga vírica y fue PCR negativo (Tabla 1). En esos días, aunque no se detectó carga vírica en el grupo control, 2 animales de este grupo fueron PCR positivos, hallándose infectados por estirpes de campo (WT1 y WT2) y no por la estirpe de la i.e. (EV1), según datos de PCR y secuenciación.

El efecto protector de la inmunización frente a *env* se confirmó entre los 4 y 25 días post i.e., pues los 6 animales control presentaron evidencia de infección (por cocultivos y/o PCR) y sólo 2 de los 6 animales inmunizados la presentaron (sólo por cocultivos y sólo el día 25). Así, ambas pruebas, la PCR empleada y cocultivos fueron valiosas para detectar VMV, pero quizá una PCR cuantitativa simplificaría la cuantificación de estirpes conocidas.

Los AcNT sólo se produjeron en animales del grupo control, en títulos muy bajos y no se detectaron hasta los 25 días post i.e. (formándose en 4 animales, al menos hasta los 60 días post i.e.). En conjunto, estos resultados demuestran: a) el efecto profiláctico de la vacuna frente a EV1 en un rebaño infectado en condiciones naturales y lo sugieren para estirpe de campo (WT3); b) que el VMV es detectable por la PCR puesta a punto o cocultivos antes que por anticuerpos y que bajas dosis en la i.e. conducen a bajos títulos de AcNt durante la infección (como observan Cuisinier et al., 1997); y c) que los AcNT no eliminan la infección y se detectan en ovinos con mayor presencia vírica (grupo control), sugiriendo que el "escape mutacional" del VMV es más rápido que la producción de AcNT frente a él.

REFERENCIAS

Andresdóttir et al., 2002. J. Gen. Virol 83: 2543-2551; **Bird** et al., 1993. J. Virol. 67: 5187-5197; **Cuisinier** et al., 1997. Vaccine 15: 1085-1094; **González** et al., 1999. ITEA Extra 20 (II): 369-371; **González** et al., 2001a. ITEA Extra 22 (I): 191-193; **González** et al., 2001b. ITEA Extra 22 (I): 194-196; **González** et al., 2002b. XXVII Jornadas SEOC. Valencia. p 625-629; **Horton** et al., 2002. J. Virol. 76: 7187-7202; **Ourmanov** et al., 2000. J. Virol 74: 2740-2751; **Tolari** et al., 2000. International Conference Animal Retroviruses. Vol 1. Queen's College. Cambridge, U.K. p 61; **Woodall** (Universidad de Edimburgo, comunicación personal).

Tabla 1. Detección de VMV por PCR y cocultivos ^a, y de respuesta humoral frente a VMV por ELISA y anticuerpos neutralizantes (AcNt), en un estudio longitudinal realizado en animales inmunizados frente a VMV (i) y control (c), antes (*pre i.e.*) y tras infección experimental (*post.i.e.*).

Animal y grupo	ELISA/PCR ^b <i>pre i.e.</i>		Carga vírica/AcNt/ PCR (estirpe) a 0 y 4 d <i>po. c.</i>	Carga vírica/ AcNt/PCR a 8-14 d <i>po.c.</i>	Carga vírica/PCR (estirpe) a 25 d <i>po.c.</i>	ELISA <i>po. c.</i> /Título AcNt a 25 d <i>po. c.</i> (y a 60 d <i>po. c.</i>)
	5 s, 1 s <i>po.</i> -1 ^a in, 3 s <i>pre</i> -2 ^a in ^b	2 s, día de 2 ^a in (estirpe)				
6317 c	-/-	-/+	0/0/ +4d (WT1)	+ /0/8d -	++/-	-/2,5 (2 a 60 d)
7207 c	-/-	-/+	0/0/ -4d	++ /0/8d -	0/-	-/2,5 (2 a 60 d)
5017 c	-/-	-/-	0/0/ +4d (WT2)	0 /0/8d -	++/+ (WT3)	-/2,5 (2 a 60 d)
5040 c	-/-	-/-	0/0/ -4d	0 /0/8d -	0/+ (EV1)	-/2,5 (2 a 60 d)
7218 c	-/-	-/-	0/0/ -4d	0 /0/8d NT	+/+ (EV1)	-/2,5 (0 a 60 d)
5117 c	-/NT	-/NT	0/0/ -4d	++ /0/8d NT	+/-	-/2,5 (1 a 60 d)
5033 i	-/-	-/-	0/0/ -4d	0 /0/8d -	++/-	-/0 (hasta 60 d)
5039 i	-/-	-/-	0/0/ -4d	0 /0/8d NT	+/-	-/0 (hasta 60 d)
5076 i	-/-	-/NT	0/0/ -4d	0 /0/8d -	0/-	-/0 (hasta 60 d)
7320 i	-/NT	-/-	0/0/ -4d	0 /0/8d NT	0/-	-/0 (hasta 60 d)
6842 i	-/-	-/+	0/0/ -4d	0 /0/8d NT	0/-	-/0 (hasta 60 d)
7331 i	-/-	-/+ (WT3)	0/0/ -4d	0 /0/8d -	0/-	-/0 (hasta 60 d)

^a Carga vírica: 0, nula; +, < 2; ++, entre 2,1 y 10; PCR: +, reacción; - ausencia de reacción; NT no testado.

^b Tests ELISA y PCR realizados a las 5 semanas antes de la *i.e.*, es decir, 1 semana (s) tras la 1^a inmunización o 3 s antes de la 2^a. WT: PCR⁺ en esta fecha, la secuencia corresponde a una estirpe de campo (WT1, WT2, W3).

EV1: PCR⁺ en esta fecha, la secuencia corresponde a la estirpe (EV1) inoculada en la *i.e.* y utilizada para inmunización (i.).

AGRADECIMIENTOS

Financiado por: CICYT (AGL2000-1489-C02), INIA(RTA01-107-C3-1) y UE (QLK2-CT-2002-00617 y CRAF-1999-70356). Dr. Y. Chebloune, Universidad de Lyon, por el plásmido pCR3.1-*IFN-γ* de caprinos; Dres. B. R. Dalziel, M. Esteban, D. Rodríguez y J.R. Rodríguez por el material y las restantes construcciones para los inóculos vacunales; Dra. S. Hervás-Stubbs por su colaboración en la puesta a punto en la técnica de PCR; S. Andrés, por su colaboración en los ensayos inmunológicos. Dr. L. Luján por su colaboración en las inoculaciones intratraqueales; personal encargado del cuidado y manejo de los animales (F. Lahoz, E. Morago, E. Echegoyen); y Servicio de Investigación Agraria por su apoyo y por brindar las instalaciones ganaderas.