

OPTIMIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO DEL VIRUS MAEDI VISNA POR PCR DE LA REGIÓN POL

S. Andrés,¹ I. Glaria,¹ I. García,¹ M. I. Mora,¹ R. Reina,¹ E. Berriatua,² V. Alvarez,² R. Juste,² G. Aduriz,² M. Daltabuit,² B. Amorena,¹ D. De Andrés¹

¹SIA (DGA) Av. De Montañana 930, 50059 Zaragoza e Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales, CSIC-UPNA. Ctra. Mutilva Baja, 31192 Mutilva Baja; Navarra
²NEIKER. c/ Berreaga, 1, 48160 Derio, Vizcaya

INTRODUCCIÓN

El tropismo es uno de los mecanismos fundamentales para comprender la patogenicidad de los lentivirus. Dado que el Maedi Visna ovino (VMV) infecta a la línea monocito-macrófago, su detección a partir de células sanguíneas ovinas por PCR puede presentar dificultades, pues el porcentaje de monocitos en sangre ovina así como el número de copias de DNA de VMV por monocito sanguíneo en ovinos infectados son reducidos (Carey y Dalziel, 1993). Además, el VMV presenta una gran variabilidad a lo largo de su genoma debido a la alta tasa de mutación por ciclo reproductivo, por lo que el diseño de cebadores de utilización universal es difícil. En este trabajo se muestra cómo el diagnóstico de la infección natural por VMV en ovinos adultos y jóvenes mediante PCR, se ve afectado por la elección de: a) la fracción celular de la que se obtiene el DNA; b) la cantidad de DNA en el tubo de reacción; c) la zona diana del genoma viral a amplificar (Pol frente a otras); y d) la metodología PCR, sencilla frente a semianidada. Los resultados obtenidos pueden contribuir a la optimización de la sensibilidad del diagnóstico del VMV mediante PCR.

MATERIAL Y MÉTODOS

Origen y preparación de muestras. Se utilizaron ovinos Latxa Navarra de 4 a 5 años y corderos Latxa Vasca de 0 a 10 meses. Para la detección por PCR de VMV en adultos, se utilizaron leucocitos mononucleares (**PBMC**) aislados por flotación (Ficoll-Hypaque, $d = 1,077$; Lymphoprep Asix-Shield, Oslo) a partir de sangre con EDTA tripotásico, sometiéndose en su caso, al aislamiento de **fagocitos** mediante Dynabeads (DynaL Biotech GmbH, Hamburg, Alemania) (Dr. Houwers, Universidad de Utrecht, comunicación personal). El DNA se obtuvo por el sistema QIAamp DNA Blood Midi Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania). La cantidad de DNA por reacción dependió del procedimiento de obtención celular: un rango de 100 a 1500 ng en el caso de PBMC y de 20 a 500 ng en el de fagocitos. El DNA de corderos se obtuvo mediante el tratamiento con lisozima, proteinasa K y fenol-cloroformo-alcohol isoamílico de leucocitos (**PBL**) de sangre con EDTA tripotásico (Extramiana, 1999). El DNA de los PBL se estudió a las concentraciones de 500 y 1500 ng.

ELISA. Se determinó la seropositividad al VMV utilizando el test ELISA Innostest MVV (actualmente Elitest, MV Diagnostics, Edimburgo, Gran Bretaña).

PCR. El VMV en sangre se detectó por PCR de la región Pol (PCR-Pol)(C. Woodall, Universidad de Edimburgo, comunicación personal; Tolari et al., 2000), siguiendo una metodología semianidada puesta a punto por nuestro grupo. En los casos indicados, se realizó PCR de las regiones LTR (PCR-LTR) (PCR anidada, Ryan et al., 2002) y/o Gag (PCR-Gag) (PCR sencilla, D. Klein, Universidad de Viena; comunicación personal).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la fracción celular, cantidad de DNA, región viral diana y número de amplificaciones, para la reacción PCR. La Tabla 1 recoge los resultados del estudio comparativo de detección del VMV por PCR de Pol sencilla (1ª PCR) y semianidada (2ª PCR) en ovinos adultos, empleando cinco concentraciones distintas de DNA procedente de PBMC o fagocitos, así como la resultados de PCR de las regiones Gag, LTR y Pol.

Tabla 1. Resultados de los distintos análisis PCR en relación con la fracción celular de la que procede el DNA (fagocitos o PBMC), cantidad de DNA (ng) utilizada, reacción (1ª ó 2ª) de amplificación, región diana para la PCR (Pol, Gag, LTR) y resultados de positividad/negatividad (p/n) en ELISA y valor ELISA.

Oveja	PCRPol ¹ en DNA de fagocitos					PCRPol ¹ en DNA de PBMC					PCR ² en DNA de PBMC			ELISA	
	20 ng	50 ng	100 ng	300 ng	500 ng	100 ng	300 ng	500 ng	1000 ng	1500 ng	1000 ng			p/n	Valor
	1ª/2ª	1ª/2ª	1ª/2ª	1ª/2ª	1ª/2ª	1ª/2ª	1ª/2ª	1ª/2ª	1ª/2ª	1ª/2ª	Pol 2ª	Gag 1ª	LTR 2ª		
997461	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-	-	-	-	0,096
971271	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/>+	+/>+	+	+	+	+	6,051
971295	-/+	-/+	-/>+	-/+	-/+	+/>+	+/>+	+/>+	+/>+	+/>+	+	+	+	+	11,346
99973	-/+	-/>+	-/+	+/>+	-/-	+/>+	+/>+	+/>+	+/>+	+/>+	+	-	-	-	0,493
984035	-/+	+/>+	+/>+	+/>+	-/>+	-/-	-/-	-/>+	-/+	-/+	+	+	-	-	0,013
971293	-/-	-/+	-/+	-/+	-/>+	+/>+	+/>+	+/>+	-/>+	+/>+	+	+	+	+	9,795
984049	-/+	+/>+	+/>+	+/>+	+/>+	-/+	+/>+	+/>+	+/>+	+/>+	+	-	-	+	6,597
961588	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/>+	-/>+	-/>+	+	-	+	+	5,795
997435	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/>+	+/>+	+/>+	+/>+	+/>+	+	+	+	+	10,295
Negra	-/+	-/+	-/+	-/>+	-/-	-/+	+/>+	-/>+	+/>+	-/>+	+	-	-	+	5,853

¹ Los resultados PCR se determinaron por observación en gel de agarosa de los fragmentos de DNA amplificados, revelados con Bromuro de Etidio. – significa ausencia de amplificación específica; + amplificación específica débil, ++ amplificación específica media, +++ amplificación específica alta.

² Los resultados PCR se determinaron como se ha indicado en (¹). – ausencia de amplificación específica; + amplificación específica.

Contrariamente a lo esperado, se observó una mayor sensibilidad en la PCR, en cuanto al número de individuos positivos, cuando se utilizaron PBMC como fuente de DNA. Con PBMC, las cantidades de DNA que permitieron una mayor detección fueron de 500 a 1500 ng y con fagocitos, de 50 a 300 ng. En ambos casos fue necesaria una PCR semianidada para obtener mayor sensibilidad. En los individuos PCR positivos el grado de reacción observado difería al emplear como fuente de DNA los PBMC o los fagocitos, siendo el rendimiento celular mayor en el caso de PBMC. Así, para las regiones Gag y LTR se utilizaron PBMC (1000 ng de DNA), con el fin de averiguar si la sensibilidad en PCR para estas zonas era semejante a la obtenida en la región Pol (Tabla 1). La PCR-Pol fue más sensible (9 reacciones) que las de Gag y LTR (5 reacciones) **Comparación de resultados ELISA y PCR semianidada de la región Pol en animales de menos de 10 meses.** En PBL de animales de corta edad (130 animales, 181 muestras de sangre y suero), se observó que la PCR de la región Pol tenía valor diagnóstico, existiendo entre los corderos seronegativos en ELISA animales PCR-Pol positivos y viceversa (Tabla 2). Las discrepancias se contrastaron por PCR -LTR: 4 de los 18 ELISA positivos Pol negativos y todos los Pol positivos ELISA negativos(4/4), fueron positivos por PCR -LTR. Además, se detectaron más positivos en PCR- Pol al utilizar 1500 ng en lugar de 500 ng (40 frente a 33).

Tabla 2. Resultados obtenidos en PBL de corderos menores de 10 meses mediante PCR Pol semianidada (utilizando 500 y 1500 ng de DNA) y resultados ELISA.

ELISA	PCR Pol (DNA 500ng / 1500ng)		Total
	+	-	
+	30/36	24/18	54
-	3/4	124/123	127
Total	33/40	148/141	181

En conjunto, estos resultados demuestran que ambas pruebas, ELISA y PCR -Pol tienen un valor diagnóstico importante para detectar la infección del VMV tanto en adultos como a una edad temprana y que la correcta elección de la fracción celular, la cantidad de DNA, la metodología PCR (anidada o semianidada) y la región del genoma viral a amplificar en la PCR, es fundamental para mejorar la sensibilidad del método de diagnóstico empleado.

REFERENCIAS

Carey N. and Dalziel R.G. 1993. Brit.Vet.J. 149: 437-454; **Extramiana A.B.** 1999. Desarrollo y evaluación de nuevas técnicas de diagnóstico del Maedi-Visna. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria; **Houwers D.** (Comunicación personal). **Klein D.** (Comunicación personal); **Ryan S. et al.** 2002. J. Virol. 74(21): 10096-10103; **Tolari F. et al.** 2000. International Conference and Workshop on Animal Retroviruses, vol 1. Queen's College, Cambridge, U.K. p. 61; **Woodall C.** (Comunicación personal).

AGRADECIMIENTOS

Financiado por CICYT (AGL2000-1489-C02), INIA (RTA01-107-C3-1), UE (QLK2-CT-2002-00617 y CRAF-1999-70356). A la Dra S. Hervás-Stubbs por su contribución a la puesta a punto de la PCR de Pol. A los ganaderos por su amable colaboración al brindarnos la oportunidad de realizar este estudio.