

PRIMER AISLAMIENTO DE UNA ESTIRPE ESPAÑOLA DEL VIRUS MAEDI VISNA OVINO

R. Reina¹, I. Glaria¹, N. Lucas¹, X. de Andrés¹, C. Solano¹, E. Biescas², L. Luján², M. M. Pérez², V. Andresdóttir³, B. Amorena¹, D. de Andrés¹

¹*Instituto de Agrobiotecnología, CSIC-UPNA, Ctra. Mutilva Baja, 31192 Mutilva Baja, Navarra;* ²*Dpto. de Patología Animal, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza;* ³*Institute for Experimental Pathology, University of Iceland, Keldur, v/Vesturlandsveg, IS-112 Reykjavik, Iceland*

INTRODUCCIÓN

Nuestro país cuenta con unos 30 millones de pequeños rumiantes (ovinos y caprinos), hallándose el virus Maedi Visna (VMV) ampliamente extendido. Hasta el momento actual, se han logrado amplificar algunas zonas del genoma del virus utilizando PCR, pero no se han obtenido aislados de campo ovinos españoles que conserven su capacidad infectante. En este trabajo, se han obtenido aislados ovinos españoles a partir de un animal con sintomatología clínica (artritis). Una vez aislada la estirpe del virus implicado, con capacidad infectante, se ha caracterizado ésta genéticamente y comparado su secuencia con las de muestras de otros tejidos del mismo animal y con secuencias conocidas del GenBank. El conocimiento genético de las estirpes capaces de producir la enfermedad del Maedi Visna es de utilidad para comprender los mecanismos de patogenicidad y la epidemiología, así como para desarrollar métodos de diagnóstico e inmunógenos de interés en razas locales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales. Se escogieron 10 animales de la raza Rasa Aragonesa con sintomatología articular compatible con Maedi Visna, ubicados en dos explotaciones con una seroprevalencia del 90 por ciento, según ELISA (Elitest, Hyphen Biomed). Esta sintomatología no es frecuente en la zona y raza objeto de estudio y podría responder a un brote de una cepa con especial tropismo por la articulación. En algunos casos, estos síntomas articulares se acompañaron de evidente clínica pulmonar, según análisis macroscópico en la necropsia.

Muestras. Las muestras analizadas en la necropsia fueron lavado broncoalveolar en solución salina tamponada estéril (PBS) y líquido sinovial para el aislamiento de virus por co-cultivo. Para el estudio de PCR, se emplearon tejido articular, pulmón, mama y encéfalo, todos ellos en bloques de 1 cm³ embebidos en RNAlater (Qiagen).

Empleo de células de lavado broncoalveolar. Tras centrifugar 5 min a 400 × g, se resuspendió el sedimento (rico en macrófagos alveolares) en 1-5 ml de RPMI (GIBCO) conteniendo suero fetal bovino (SFB, GIBCO) al 10%, se realizó el recuento (con cámara de Neubauer, Marienfeld) y se distribuyeron 10⁷ células sobre una monocapa de células permisivas a la infección por VMV (véase sección de co-cultivos) en DMEM (GIBCO) con 1% SFB o suero de cordero.

Empleo de líquido articular. Se distribuyó el líquido directamente obtenido de ambos carpos sobre la monocapa de células permisivas en DMEM al 1%.

Co-cultivos para aislamiento de la estirpe. Se emplearon dos tipos de células adherentes permisivas para todos los experimentos de aislamiento viral, FOS (foetal ovine synovial) y células del plexo coroideo ovinas (PLEXUS). Ambas provenían de cultivo primario, se utilizaron en pases tempranos (inferiores a 15) y no daban lugar

a amplicones de VMV con las técnicas PCR disponibles en el laboratorio. Estas células se cultivaron hasta obtener “semi-confluencia” y entonces se co-cultivaron (en DMEM conteniendo suero de cordero al 1%) con líquido articular de ambos carpos o con 10^7 células de lavado broncoalveolar de las ovejas afectadas clínicamente. Transcurridos 11 días, se tripsinizaron los cultivos y las células se sembraron en placas nuevas. Se recogieron sobrenadantes periódicamente y se detectó en ellos actividad transcriptasa inversa (RT) cuando se observó una alta mortalidad (a los 16 días), asociándose esta actividad a la presencia de VMV en las células FOS y PLEXUS, según PCR-secuenciación. El sobrenadante entonces se congeló (como stock de virus), y una alícuota se utilizó para infectar fibroblastos heterólogos, induciendo en ellos la formación de sincitios y la propagación de la estirpe aislada.

Actividad RT en el sobrenadante de cultivo. Como medida indirecta de la cuantificación del virus en el cultivo, se determinó en el sobrenadante a los 9 días de co-cultivo la actividad RT utilizando un kit no radiactivo (The Reverse Transcriptase Assay, Boehringer Mannheim), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó la quimioluminiscencia por densitometría (ChemiDoc, Bio-Rad).

PCR. Las muestras de tejido y las células en cultivo cuyo sobrenadante presentaba actividad RT se tripsinizaron y, tras la extracción de ADN (QUIAamp DNA blood mini kit, Qiagen), se analizaron por PCR-secuenciación de nucleótidos (nt) para las regiones de VMV: a) Gag p17-p25 (amplicones de 480-500 nt), utilizando cebadores generados en el proyecto europeo CRAF-1999-70356 y por Rimstad *et al.* (1993); y b) LTR (amplicones de 281 a 325 nt) según metodología de Extramiana *et al.* (2002) y utilizando cebadores de Sonigo *et al.* (1985).

Análisis de secuencias. Las secuencias del genoma del VMV obtenidas con ambas fuentes de muestra se compararon, mediante el programa BioEdit (Hall, 1999), entre sí, con las de la base de datos GenBank (NIH) y con amplicones de VMV de dos ovinos españoles (365 y 378; datos no publicados). Los alineamientos múltiples se realizaron con el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Los árboles filogenéticos se produjeron por el método del Neighbour Joining (Saitou y Nei, 1987) y se visualizaron y editaron mediante el programa TreeView (Page, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento del virus. Se obtuvieron sobrenadantes con actividad RT en 2 de los animales estudiados, 496 y 44. En ambos casos el co-cultivo positivo se obtuvo utilizando como material de inóculo, el líquido sinovial. Uno de ellos (aislado 496) se utilizó para análisis comparativo de secuencias en este trabajo.

Secuencias y homología. En ambos aislamientos, se observó que las secuencias obtenidas diferían del resto de aislados secuenciados y publicados en GenBank, así como de los amplicones obtenidos en nuestro laboratorio a partir de muestras de campo de ovinos españoles (datos no publicados). En la secuencia del aislado 496 se observaron resultados similares al estudiar las regiones LTR y Gag: a) mayor semejanza genética (porcentaje de homología 0,88-0,99) al compararla con otras secuencias víricas, obtenidas de diferentes tejidos del mismo animal en que se aisló (PBMC, mama, cápsula articular, pulmón, cultivos de células FOS “CCF” y PLEXUS “CCP” inoculadas con el líquido sinovial de la cápsula articular de los carpos izquierdo “CI” o derecho “CD”), o con secuencias como 365 (de ovino español con VMV) y CAEV-Co, prototipo de lentivirus caprino estadounidense (GenBank); y b) un menor porcentaje de homología (0,46-0,69) con prototipos (GenBank) de VMV

aislados de ovinos procedentes de países como Portugal (PO1OLV), Islandia (Ic1514), Reino Unido (EV1 o sus secuencias tras subcultivos en nuestro laboratorio, C+L y C+H) o el prototipo de virus caprino de Noruega (CAEV1GA), y en la región Gag, con la secuencia 378 de VMV ovino español. Aunque a menudo pequeñas, se observaron diferencias entre tejidos dentro de un mismo individuo, lo que demuestra la existencia de variabilidad (cuasi-especies virales) en un solo huésped, y una proximidad a algunos aislados ovinos (español) y caprinos (CAEV-Co, causante de artritis) pero no a los otros aislados caprinos y ovinos estudiados, sean o no de origen español (Fig. 1).

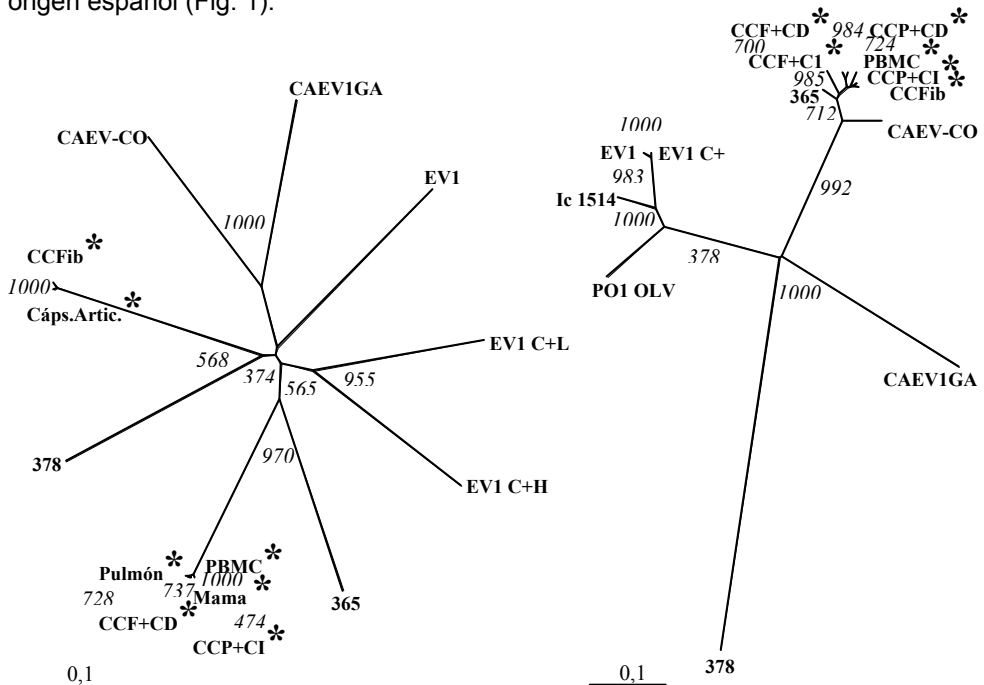


Figura 1. Árboles filogenéticos basados en secuencias de nucleótidos de las regiones LTR (izquierda) y Gag p25-p17 (derecha), mostrando las relaciones de las secuencias derivadas del aislado 496 entre sí, con las prototipo (GenBank) de lentivirus ovinos y caprinos y con dos de origen español (365 y 378). Los números en cursiva hacen referencia a los “bootstraps”. El asterisco corresponde a las secuencias del aislado 496.

REFERENCIAS

- Extramiana et al.** 2002. *Small Rum Res* 44: 109-17;
Rimstad et al. 1993 *Am J Vet Res* 54: 1858-62;
Sonigo et al. 1985 *Cell* 42: 369-82.
Hall.1999. *Nucleic Acids Symposium Ser.* 41: 95-98;
Thompson et al. 1994. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-80;
Saitou y Nei. 1987. *Mol Biol Evol* 4: 406-25;
Page. 1996 *Comput Appl Biosci* 12: 357-8.

AGRADECIMIENTOS

Financiado por CICYT AGL2003-08977-C03-01, EU QLK2-CT-2002-00617 y EU LIFE-CRAFT No. CRAF-1999-70356.