

DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS JSRV EN INTESTINO DELGADO Y NÓDULOS LINFÁTICOS MESENTÉRICOS DE CORDEROS HIJOS DE OVEJAS INFECTADAS

Borobia, M.*, Ramos, J.J., Ferrer, L.M., García de Jalón, J.A., Ortín, A. y De las Heras, M.
Departamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria. Miguel Servet 177. 50013
Zaragoza. *E-mail: mborobia@unizar.es.

INTRODUCCIÓN

El adenocarcinoma pulmonar ovino (APO, adenomatosis pulmonar ovina, jaagsiekte) es una neoplasia contagiosa que afecta al pulmón de los ovinos. Está muy difundida en nuestro país y representa entre un 20-30% de los problemas respiratorios crónicos de este ganado. Esta enfermedad está causada por un betaretrovirus exógeno (JSRV) que se replica principalmente en los neumocitos tipo II y en las células bronquiales no ciliadas (células Clara) (Palmarini et al., 1996, 1999). Se piensa que la vía principal de transmisión de la enfermedad es la aerógena, a través del fluido pulmonar que eliminan los animales clínicamente afectados, que tiene un alto contenido en partículas víricas (Sharp y Herring, 1983; Sharp y DeMartini, 2003). Sin embargo, utilizando técnicas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), se ha conseguido demostrar la existencia de un estado virémico y de una diseminación del virus en diversos tejidos linfoides y en leucocitos de sangre periférica (linfocitos B, T y monocitos), tanto de animales clínicamente afectados como de animales con infección subclínica (Palmarini et al., 1996; González et al., 2001). Este hecho sugiere la posibilidad de que existan otras vías de transmisión además de la aerógena, en concreto la vía vertical a través de las secreciones lácteas, ya que el calostro contiene una gran cantidad de células linfoides y monocíticas que pueden atravesar la barrera intestinal de los corderos neonatos y colonizar sus nódulos linfáticos (Tuboly et al., 1995; Tuboly y Bernath, 2002). En este sentido, nuestro grupo de investigación, en colaboración con otros grupos europeos que también trabajan en esta enfermedad, ha demostrado recientemente la presencia de ADN proviral en calostros y leche de ovejas infectadas por JSRV, y la presencia del provirus en la sangre de algunos de los corderos que fueron alimentados con estos calostros (Grego et al., 2008).

El objetivo de este trabajo ha sido aportar nuevas evidencias que permitan confirmar la transmisión del JSRV a través del calostro. Para ello, se ha evaluado el intestino delgado y los nódulos linfáticos mesentéricos de corderos neonatos nacidos de hembras infectadas por JSRV y amamantados de forma natural con calostros maternos, buscando la posible presencia del virus en estos tejidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Toma de muestras de tejidos de corderos:

Los corderos utilizados en el presente estudio preliminar, pertenecen a un Proyecto de Investigación más amplio en el cual se pretende estudiar a corderos hijos de 22 ovejas infectadas por JSRV de forma natural, y de 7 ovejas libres de la infección. El ciclo reproductivo de estas hembras fue controlado mediante esponjas vaginales de progestágenos (acetato de flugestona) que se retiraron a los 14 días tras su colocación. A continuación, se inoculó a cada animal una dosis de 400-450 Unidades Internacionales de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) por vía intramuscular. Los corderos nacieron de forma natural y los partos fueron supervisados con el objetivo de poder solucionar cualquier complicación que pudiera surgir. Tras el nacimiento, fueron secados e identificados, se les desinfectó el cordón umbilical y se les inoculó un complejo vitamínico AD₃E. Se dejó que mamasen libremente de sus madres, controlando que el encalostro se realizara de forma adecuada. Los animales fueron incluidos de manera aleatoria en lotes homogéneos en número y fueron sacrificados según el siguiente patrón: inmediatamente tras el nacimiento sin haber ingerido calostro, a las 12, 24, 48 y 72 horas tras el nacimiento y a los 5 y 10 días tras el nacimiento.

Los corderos fueron sacrificados humanitariamente siguiendo los métodos y productos recomendados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la

Universidad de Zaragoza (CEAUAZ). Tras el sacrificio, se procedió a la realización de las necropsias en las que se recogieron muestras de duodeno, yeyuno, íleon terminal (que contiene placas de Peyer) y nódulos linfáticos mesentéricos de los distintos tramos intestinales, utilizando material estéril para cada una de ellas. Las muestras de tejidos se tomaron por duplicado de modo que una parte se fijó con buffer de cinc y se procesó para realizar la técnica de inmunohistoquímica, y otra parte fue congelada en N₂ líquido y se almacenó a -80° C hasta su posterior análisis mediante PCR.

Para este trabajo preliminar que presentamos, se seleccionaron los citados tejidos de un grupo de 14 corderos hijos de ovejas infectadas por JSRV de forma natural y de otro grupo de 7 corderos descendientes de ovejas libres de la infección.

Detección de la presencia de JSRV en las muestras de intestino y nódulos linfáticos mesentéricos:

Se analizó la presencia de ADN proviral de JSRV mediante PCR y la presencia de proteínas estructurales de JSRV mediante inmunohistoquímica.

PCR: Se utilizó un kit comercial (QIAamp DNA Mini Kit, de Qiagen) para extraer el ADN de las muestras de estos tejidos. Una vez extraído el ADN, éste fue cuantificado mediante un espectrofotómetro NanoDrop y se realizó el PCR específico (Palmarini et al., 1996) analizando tres réplicas de cada muestra. Como control positivo se utilizó el plásmido LTR-gag pGEM-T. También se incluyeron controles negativos, tanto durante la extracción del ADN como durante la amplificación. Los productos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. Con el fin de evitar contaminaciones cruzadas, las fases de extracción de ADN, preparación de la mezcla de PCR y electroforesis se llevaron a cabo en laboratorios físicamente separados y distanciados, y se empleó una solución de ácido clorhídrico para descontaminar las superficies y el material de trabajo.

Inmunohistoquímica: Las secciones de duodeno, yeyuno, íleon terminal y nódulos linfáticos mesentéricos se analizaron mediante procedimientos inmunohistoquímicos rutinarios, empleando el sistema Avidina-Biotina peroxidasa de Vector. Como antisueros primarios se emplearon JSRV-MA frente a proteínas de la cápside de JSRV y JSRV-SU frente a las proteínas de superficie de este virus.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PCR: En ninguna de las muestras de tejidos analizadas se detectó un resultado positivo.

Inmunohistoquímica: Dentro del grupo de controles positivos, en muchas de las muestras de tejidos analizadas se han detectado células claramente positivas utilizando el anticuerpo anti JSRV-MA, aunque en número muy reducido. Este hecho explicaría la falta de positividad encontrada utilizando la técnica de PCR. Aunque los resultados son todavía preliminares y hacen referencia a un número limitado de animales, resultan bastante alentadores, ya que el patrón encontrado parece estar asociado con la edad del individuo. Como puede observarse en la Tabla 1, en los corderos de pocas horas de vida la positividad se encuentra sólo en las células de tramos intestinales, mientras que en los de edad más avanzada sólo se observa en las células de los nódulos linfáticos mesentéricos, detectándose en ambos tejidos en animales de edades intermedias. Utilizando el otro anticuerpo, anti JSRV-SU, el número de muestras positivas ha sido mucho menor, si bien las muestras que han sido positivas con este anticuerpo también lo han sido con el primero.

También se han testado todas las muestras de tejidos pertenecientes a los corderos controles negativos utilizando los dos anticuerpos. No se ha encontrado positividad en ninguna de ellas.

Estos datos muestran que el virus, integrado dentro de células, es capaz de atravesar la barrera intestinal y colonizar los nódulos linfáticos mesentéricos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- González, L., García-Goti, M., Cousens, C., Dewar, P., Cortabarría, N., Extramiana, A.B., Ortín, A., De Las Heras, M., Sharp, J.M. 2001. *J. Gen. Virol.* 82:1355-1358.
- Grego, E., De Menegh, D., Álvarez, V., Benito, A.A., Minguijón, E., Ortín, A., Matón, M., Moreno, B., Pérez de Villarreal, M., Alberti, A., Capucchio, M.T., Caporale, M., Juste, R., Rosati, S., De las Heras, M. 2008. *Vet. Microbiol.* 130:247-257.
- Palmarini, M., Holland, M.J., Cousens, C., Dalziel, R.G., Sharp, J.M. 1996. *J. Gen. Virol.* 77: 2991-2998.
- Palmarini, M., Sharp, J.M., De las Heras, M., Fan H. 1999. *J. Virol.* 73:6964-6972.
- Sharp, J.M., Herring, A.J. 1983. *J. Gen. Virol.* 64:2323-2327.
- Sharp, J.M., DeMartini, J.C. 2003. *Curr. Top. Microbiol.* 275: 55-80.
- Tuboly, S., Bernáth, S., Glávits, R., Kovács, A., Megyeri, Z. 1995. *Acta. Vet. Hung.* 43:105-115.
- Tuboly, S., Bernáth, S. 2002. Ed: Davis M.K. et al. Kluwer Academic/Plenum Publishers. 107-114.

Tabla 1: Detección de la presencia del virus JSRV por métodos inmunohistoquímicos en tejidos de corderos de diferentes edades, utilizando los anticuerpos JSRV MA y JSRV SU.

Nº cordero	Edad al sacrificio	JSRV MA	JSRV SU
1	Sin ingerir calostro	Negativo	Negativo
2	Sin ingerir calostro	Negativo	Negativo
3	12 h	Negativo	Negativo
4	12 h	PP	PP
5	24 h	PP y NLMES	Negativo
6	24 h	PP	Negativo
7	48 h	Negativo	Negativo
8	48 h	Negativo	Negativo
9	72 h	PP y NLMES	Negativo
10	72 h	NLMES	Negativo
11	5 d	NLMES	Negativo
12	5 d	NLMES	Negativo
13	10 d	NLMES	NLMES
14	10 d	NLMES	Negativo

PP: Positivo en placa de Peyer. NLMES: Positivo en nódulo linfático mesentérico.

JSRV CAN BE DETECTED IN SMALL INTESTINE AND MESENTERIC Lymph NODES OF LAMBS FROM JSRV INFECTED EWES

ABSTRACT: Ovine pulmonary adenocarcinoma is a contagious lung cancer of sheep, very common in Spain. This disease is caused by an exogenous betaretrovirus (JSRV) that replicates in the type II pneumocytes and Clara cells in the lung. Respiratory route is supposed to be the main route of transmission, by lung fluids from clinically affected animals. Studies using PCR techniques found JSRV in lymphoid tissues and in peripheral blood mononuclear cells, in diseased or healthy in-contact animals, suggesting that other routes of transmission could be involved. Colostrum contains high number of lymphoid and monocytic cells that can pass the intestinal barrier of newborn lambs and colonize their lymph nodes. The objective of this study was to evaluate the presence of JSRV in the small intestine and mesenteric lymph nodes of lambs from JSRV infected ewes and fed by their mothers. Although the obtained results are based in a small number of animals, it looks that the type of tissue where we have detected structural proteins of JSRV depends on the age of the lamb. We have found these proteins in the small intestine of newborn lambs (< 24 hours), in mesenteric lymph nodes of older lambs (5-10 days) and in both tissues of lambs at intermediate age (24-72 hours).

Keywords: Ovine pulmonary adenocarcinoma, JSRV, colostrum, lambs.