

ELISAS DE PÉPTIDOS PARA LA DETECCIÓN DE OVINOS SEROPositIVOS FRENTE A LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES EN LA ZONA CENTRO NORTE ESPAÑOLA

Ramírez, H.^{1a}, de Andrés, X.^{1a}, Reina, R.¹, San Román, B.¹, Glaria, I.¹, Crespo, H.¹, Jauregui, P.¹, Leginagoikoa, I.², Minguijón, E.², Juste, R.², Salazar, E.³, Pérez, M.M.³, Luján, L.³, Polledo, L.⁴, García-Marín, J.F.⁴, Riezu, J.I.⁵, Borrás, F.⁵, de Andrés, D.¹, Amorena, B.^{1*}

¹ Instituto de Agrobiotecnología (CSIC-UPNA-Gobierno de Navarra) 31192 Navarra;

² NEIKER-Tecnalia, 48160 Derio, Bizkaia; ³ Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, 21191 Zaragoza; ⁴ Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León; ⁵ Centro de Investigación y Medicina Aplicada, 31008 Navarra.

*E-mail: bamorena@unavarra.es.^a Ramírez y de Andrés han contribuido por igual al trabajo.

INTRODUCCIÓN

Para el diagnóstico de Lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR), que agrupan al virus Maedi Visna (VMV) y al de la artritis encefalitis caprina (VAEC), se dispone de pruebas serológicas, siendo tres los ELISAs más frecuentemente empleados en Europa: Elitest, de Hyphen-Biomed, Francia (Saman et al., 1999), de probada utilidad en ovinos españoles (Varea et al., 2001); Chekit (AG-CHEKIT CAEV / MVV kit) de IDEXX Switzerland AG, Suiza (Zanoni et al., 1994); y Pourquier (Institut Pourquier, Montpellier, Francia). El primero y el tercero emplean para el tapizado de los pocillos un péptido de la región transmembrana (TM) de la proteína de la envoltura del virus y la proteína recombinante p25 de la cápside viral simultáneamente, mientras que el segundo emplea un virus completo. Los tres tests se basan en un diseño "monoestirpe" lo que puede afectar a la eficacia del test para estirpes de distinta composición antigénica (Ramírez et al., 2009; Reina et al., 2009) y explicar que no se consideren individualmente "gold estándar". En ovinos españoles se ha demostrado que la sensibilidad del ELISA supera a la del test de inmunodifusión en agar (IDGA; Saman et al. 1999; Varea et al., 2001). Este estudio pretende investigar si el empleo de ELISAs de péptidos sintéticos, generados según la constitución genética/antigénica de estirpes locales españolas, permite detectar infecciones por LVPR en ovinos españoles, tanto los diagnosticados mediante ELISAs comerciales como los no detectados por estos tests.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron dos ELISAs disponibles (Elitest y Chekit) para, en un principio, determinar el estatus serológico (seropositivo/seronegativo) de los animales y después, hacer la comparación con los resultados obtenidos en los ELISAs de péptidos generados en este estudio. A partir de las secuencias nucleotídicas de LVPR de ovinos de la zona centro-norte española se diseñaron 5 péptidos de 15 aminoácidos de proteínas de envoltura (3 de TM; y 2 de superficie, SU) y se compararon estas secuencias entre sí y con otras disponibles en el GenBank, según el método de Glaria y col. (2009). Los péptidos correspondían a regiones hidrofílicas (Hoop y Woods, 1981; y Kyte y Doolittle, 1982) y antigénicas (Kolaskar y Tongaonkar, 1990), según el software ExPASy Proteómica del servidor: <http://www.expasy.ch/>. Los péptidos fueron sintetizados por Thermo Scientific Co.

Los animales (fuente de suero) empleados en el estudio comparativo de las pruebas ELISA fueron ovinos de la zona centro-norte española (n = 539) procedentes de los brotes por LVPR de los tipos nervioso de Castilla y León (raza Assaf) y articular de Aragón (Rasa Aragonesa), así como de rebaños mixtos respecto del tipo de LVPR, incluyendo entre ellos rebaños de Navarra (distintas razas) y País Vasco (raza Latxa). Los rebaños fueron: I (n = 50) Guipúzcoa, supuestamente con resistencia natural a LVPR porque presentaba una seroprevalencia sorprendentemente baja en Elitest en ausencia de medidas de control frente a LVPR; II (n = 50) de Vizcaya, rebaño saneado de VMV utilizando Elitest; III (n = 70), animales positivos y negativos a Elitest de diferentes razas situado en Navarra; IV (n = 157) de Castilla-León, rebaño con animales seropositivos y seronegativos a Elitest, y en el que la forma clínica principal por VMV era la nerviosa; V, (n = 118) de Aragón (todos Elitest positivos), en el que la forma clínica de la infección era articular; VI (n = 60) también de Aragón, rebaño saneado de LVPR utilizando Elitest; VII (n = 34), integrado por animales afectados clínicamente no incluidos en los grupos anteriores y procedentes de los brotes nervioso de León (n = 23 ovinos con visna) y artrítico de Aragón (n = 11 ovinos con artritis).

Como control negativo se utilizaron sueros de 135 ovinos y caprinos libres de LVPR procedentes de Italia, Islandia y Reino Unido (países libres de LVPR). Para cada ELISA de péptidos sintéticos, se calculó el punto de corte sumando a la absorbancia media de los sueros control negativo tres veces la desviación estándar. La metodología seguida para estos ELISAs consistió en sensibilizar cada pocillo con 300 ng de péptido en tampón carbonato/bicarbonato (0,1M pH 9,6). Tras un bloqueo, se añadió el suero diluido 1/20 en tampón de dilución. La reacción del péptido con los anticuerpos del suero se detectó mediante proteína G (0,2 µg/ml) y se reveló con el sustrato de la peroxidasa ABTS (Chemicon, Millipore). En los animales que presentaban discrepancias de diagnóstico entre los distintos ELISAs, se emplearon las técnicas de PCR y western blot (Ramírez et al., 2009) para confirmar la posible infección.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ensayos ELISA generados con los cinco péptidos y dos tests ELISA comerciales de referencia (Elitest y Chekit) se compararon en cuanto a la capacidad de detección de seropositivos entre 539 animales de rebaños saneados o infectados por LVPR, entre los que se incluían los de brotes de artritis (con virus de genotipo B2, tipo VAEC) y encefalitis (con virus de genotipo A, tipo VMV); y rebaños infectados con LVPR de genotipos diferentes. Según se resume en la Tabla 1, en los 4 grupos de ovinos Elitest o Chekit negativos de las poblaciones III, IV, V y VI el conjunto de los 5 ELISAs de péptidos detectó más de un 27% de animales seropositivos por población. Algunos de ellos fueron también positivos en PCR y/o western blot, corroborándose la infección y demostrándose la utilidad de los ELISAs de péptidos para detectar infecciones que escapan a su detección por ELISAs comerciales, aunque la proporción de seropositivos a los ELISAs de péptidos variaba entre rebaños y entre ELISAs. Ninguno de los ELISAs utilizados (comerciales o de péptidos) detectó por sí solo todos los animales seropositivos en la población estudiada.

En cuanto a los ELISAs de péptidos, considerados individualmente, uno de ellos resultó poco reactivo y otro de reactividad media-alta, en general; un tercer ELISA detectó más del 90% de los seropositivos en el grupo de animales del rebaño IV que eran Elitest positivos. Dicho ELISA (del péptido 98M, diseñado a partir de secuencias de la región SU V5 de la envoltura de los LVPR del brote nervioso de Castilla y León), mostró en el brote nervioso mencionado una sensibilidad y una especificidad superiores al 90% y 84%, respectivamente. Además, entre los animales afectados clínicamente (grupo VII), el 100% de los que presentaban afección nerviosa en el brote visna de León (23/23) fueron positivos en este ELISA, pero sólo una minoría (9%, 1/11) de los animales artríticos del brote de artritis de Aragón lo fueron. Los dos restantes ELISAs de péptidos reaccionaron en distinta frecuencia según el tipo de infección (VMV o VAEC), abriendo así la posibilidad futura de realizar con ambos y el ELISA de 98M una primera tipificación (VMV/VAEC), a título preliminar, de los rebaños infectados con LVPR.

En conclusión, una cuidadosa selección de la prueba de diagnóstico para la detección de seropositivos, basada en el conocimiento del tipo genético/antigénico del virus local presente en el rebaño, así como una aplicación de ELISAs o ensayos adicionales que permitan detectar la infección en animales seronegativos, son relevantes para llevar a cabo un control efectivo de la infección con el objetivo de llegar a cualificar a un rebaño como libre de LVPR.

Agradecimientos: Financiado por consejería de Industria. Gobierno de Navarra (IIQ010449.R11) y CICYT (AGL2007-66874-C04-01/GAN y AGL2010-22341-C04-01). Protegido por solicitud de patente española N° P201031774

REFERENCIAS

- Glaría, I., Reina, R., Crespo, H., de Andres, X., Ramirez, H., et al., 2009, *Vet. Microbiol.* 138,156–162.
- Hopp T.P. & Woods, K.R., 1981, *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 3824-3828.
- Kolaskar, A.S. & Tongaonkar, P.C., 1990, *FEBS Lett* 276, 172-174.
- Kyte, J. & Doolittle, R., et al., 1982, *J Mol Biol* 157, 105-132.
- Ramírez, H., San Román, B., Glaría, I., Reina, R., Hernández, M., et al., 2009, 72, 1085-1096.
- Saman E, Van Eynde G, Luján L, et al., 1999, *Clin Diagn Lab Immunol* 6, 734-740.
- Varea R., Monleon, E., Pacheco, C., Lujan, L., Bolea, R et al., 2001, *J Vet Diagn Invest* 13, 301-307.
- Zanoni, R.G, Vogt, H.R, Pohl, B. Bottcher, J.

Bommeli, W., et al., 1994, Zentralbl Veterinarmed [B] 41, 662-669. • Reina, R., Grego, E., Profiti, M., Glaria, I., Robino, P. et al, 2009, Vet Microbiol. 138, 251-257.

Tabla 1. Porcentaje de ovinos seropositivos en el conjunto de los 5 ELISAs de péptidos, Chekit y Elitest

Origen (tipo de infección)	Rebaño o grupo de ovinos		Nº sueros	Ovinos (%) seropositivos en		
	Estatus y enfermedad en el rebaño	Resultado en test comercial		ELISAs péptidos	Chekit	Elitest
I) Guipúzcoa	Con posible resistencia natural	Elitest negativo	50	44	14	0
II) Vizcaya	Infección LVPR controlada por Elitest	Elitest negativo	50	34	0	0
III) Navarra (distintos tipos LVPR)	Infección con LVPR sin afección clínica	Chekit positivo	52	69,2	100	59,6
		Chekit negativo	18	27,8	0	11,1
IV) Castilla-León (LVPR tipo VMV)	Encefalitis	Elitest positivo	96	98	88,4	100
		Elitest negativo	61	44,3	23	0
V) Aragón (LVPR tipo VAEC)	Artritis	Chekit positivo	118	71,8	100	87,2
VI) Aragón	Infección LVPR controlada por Elitest	Chekit negativo	60	36,6	0	0

PEPTIDE ELISAS TO DETECT SHEEP SEROPOSITIVE TO SMALL RUMINANT LENTIVIRUSES

ABSTRACT: Five peptides were designed according to the genetic/amino acidic sequence profiles of circulating small ruminant lentiviruses (SRLV) from sheep of North-Central Spain. The ELISAs produced with these peptides and two commercial ELISAs used as controls were tested against a panel of 539 sera, involving animals from controlled flocks as well as SRLV-induced arthritis (genotype B2) and encephalitis (genotype A) outbreaks, and animals from flocks infected with different SRLV types. The results obtained indicate that a proportion of animals seronegative to commercial tests is seropositive to one or more synthetic-peptide ELISAs. This proportion varied between flocks and between peptides. None of the commercial ELISA tests or the peptides ELISAs was able to detect all the infected animals in the studied population. One peptide ELISA (with consensus A sequence of SU V5 region of circulating SRLV) detected seropositives in most animals in the nervous outbreak (sensitivity and specificity above 90% and 84%, respectively), all the visna affected sheep tested from this outbreak and only 9% of the arthritic animals from the arthritic outbreak. Two other peptide ELISAs had different reactivity patterns in caprine arthritis encephalitis type (CAEV) and Visna/ Maedi (VMV) type infections which may be useful to genetically classify flock infection. A choice of the diagnostic test, based on the genetic/antigenic type of local circulating SRLV for the detection of seropositives, as well as the application of additional tests to detect infection amongst seronegatives, are essential to reach the SRLV-free status of the flock.

Keywords: Maedi Visna, sheep, ELISA, synthetic peptides, Elitest, Chekit