El virus maedi visna inhibe in vitro la fagocitosis de estafilococos en macrófagos ovinos

E. Monleón[a], M.C. Pacheco[a], L. Luján[c], R. Bolea[c], D. Fernández de Luco[c], M.A. Vargas[c], J. L. Alabart[b], J.J. Badiola[c] y B. Amorena[a]

[a]CSIC - Unidad de Sanidad Animal, Servicio de Investigación Agraria (DGA), Aptdo. 727, 50018 Montañana, Zaragoza; [b]Unidad de Producción Animal, Servicio de Investigación Agraria (DGA), Aptdo. 727, 50018 Montañana, Zaragoza; [c]Departmento de Patología Animal, Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria, 50013 Zaragoza

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS. La mastitis indurativa puede aparecer en ganado ovino como resultado de una infección por el virus maedi visna (VMV; 6). Mientras que in vitro el VMV es cultivado en células del plexo coroideo (CPC) a las que causa efecto citopático, en condiciones naturales el VMV infecta principalmente a monocitos y macrófagos. La mastitis ovina puede ser causada también por bacterias, frecuentemente por estafilococos (5), que han de eliminarse inmunológicamente de la gándula mediante fagocitosis (3). Se desconoce si el slime (exopolisacárido producido por algunas células de *Staphylococcus aureus*; 1) podría interferir con dicho mecanismo de defensa. En muchos casos, el animal debe afrontar simultáneamente ambas infecciones, bacteriana y vírica, por lo que sus defensas fagocíticas podrían estar comprometidas. El propósito de este estudio es determinar el efecto in vitro de la infección de macrófagos por VMV sobre la fagocitosis de estafilococos.

MATERIAL Y MÉTODOS. *Cepas de VMV y estafilococos.* Se utilizaron la cepa WLC-1 del VMV, amablemente suministrada por el Dr. F. Tolari, Turín, Italia; dos cepas de *Staphylococcus aureus* (cepa 80+ productora de slime, PS; y cepa 80- no productora de slime, NPS); y una cepa de *Staphylococcus epidermidis* (cepa 333, NPS).

Ensayo de fagocitosis: 1. Macrófagos. Se obtuvieron macrófagos de los alvéolos pulmonares (MAP) por lavado broncoalveolar con PBS estéril de pulmones obtenidos en matadero a partir de corderos sanos de 3 meses de edad. Una vez puestos en cultivo, los MAP fueron infectados con 2 $TCID_{50}$ por célula con la cepa WLC-1 de VMV los días 3, 5 y 7 antes del test de fagocitosis. El día de la fagocitosis, las células fueron desprendidas con medio RPMI-1640 (con suero fetal bovino al 10% y EDTA 10 mM); tras un lavado en este medio pero sin EDTA, se ajustó la concentración a 2,5 x 10^6 células/ml de Hank's con Ca^{2+} y Mg^{2+} (pH 7.5) a 37°C.

2. *Preparación de bacterias y zymosán.* Las bacterias en fase estacionaria, crecidas en TSB, se sometieron a un baño ultrasónico (10 min) y se lavaron tres veces en Hank's sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}, ajustándose la concentración a $1x10^9$ bacterias por ml de Hank's con Ca^{2+} y Mg^{2+} por espectrofotometría (A_{540}). El zymosán se utilizó como control de fagocitosis (en sustitución de las bacterias) a una concentración de 10 mg/ml. Las bacterias y el zymosán se opsonizaron con suero normal (1:10 vol/vol) durante 30 min at 37°C, lavándose dos veces en solución Hank's sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}, y resuspendiéndose en el mismo volumen en Hank's con Ca^{2+} y Mg^{2+}.

3. *Determinaciones de fagocitosis y quimioluminiscencia.* Para potenciar la luminescencia, se utilizó 10^{-4} M de lucigenina (bis-N-methylacridinium nitrate, Sigma) en Hank's con Ca^{2+} y Mg^{2+} (a 37°C; pH 7.5). Se distribuyeron 100 μl de partículas de zymosán opsonizado o de suspensión bacteriana junto con 100 μl de lucigenina en placas calientes (37°C) opacas con fondo plano (Luminostrip, Labsystems). Tras alcanzar 37°C, se añadieron 100 μl de una suspensión de PAM. Se utilizó un luminómetro (Luminoskan R.S. 1.0, Labsystems) para determinar el grado de fagocitosis. La emisión de luz tras la hidrólisis de ATP se midió en unidades relativas de luz (URL) durante 1 seg por pocillo cada 145 seg durante 120 min. Los resultados se analizaron utilizando los límites de un intervalo de confianza del 95% para los valores pico obtenidos al luminómetro. Para este análisis, la porción de cada curva comprendida entre el tiempo en el valor pico y 1015 seg (7 x 145 seg) fue adaptada al siguiente modelo exponencial: $RLU=C_1e^{-k_1t} + C_2e^{-k_2t}$, donde t es el tiempo en seg transcurrido tras alcanzar el valor pico (estimado como C_1+C_2, t=0). Las estimaciones de mínimos cuadrados de los coeficientes (C_1, C_2, K_1 y K_2) y sus errores estándar fueron derivados de una regresión no lineal (NLIN procedure of SAS; 7), usando el método iterativo de Newton.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN. El efecto de la infección por VMV en la fagocitosis de los estafilococos y del zymosán por MAP se muestra en la Fig 1. La fagocitosis fue inhibida significativamente ($P<0.05$) a partir del día 5 de infección por VMV y, en el caso del zymosan, a partir del día 7. Comparativamente, la fagocitosis fue más elevada para el zymosán, seguida de *S. aureus* cepa 80- NPS, *S. epidermidis* cepa 333 NPS y *S. aureus* cepa 80+ PS, en ese orden ($P<0,05$). La fagocitosis alcanzó un máximo en menos de 500 seg en el caso de *S. aureus* (PS o NPS) o zymosán, y en menos de 145 seg en el caso de *S. epidermidis*. En todos los casos, se observó un declive abrupto de la fagocitosis en los primeros 1000 seg, transcurridos los cuales el declive fue progresivo. Aunque el descenso de fagocitosis bacteriana tras la infección por VMV se ha descrito con glóbulos rojos (4). La dificultad para fagocitar las bacterias PS (cepa 80+) puede deberse a que el slime obstaculice la interacción de las opsoninas con los correspondientes receptores en las células fagocitarias (2). Ello podría relacionarse con la mayor probabilidad de infección bacteriana mamaria (8) e incremento de colonización (2).

AGRADECIMIENTOS. CICYT GAN 91-0940, INIA SC95-036 y UE AIR3 CT94-1492).

1. Baselga, R., Albizu, I., de la Cruz, M. et al, 1993. Infect. Immunity, 61: 4857-4862
2. Baselga, R., Albizu, I., Amorena, B. 1994. Vet. Microbiol. 39: 195-204.
3. Craven, N., Williams, M.R.1985 Vet. Immunol. Immunopathol., 10: 71-127.
4. Lee, W.C. 1994. PhD Thesis, University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland.
5. Marco, J.C., Romeo, L., Romeo, M., 1992. Ovis, 21: 25-43.
6. Molen, E.J.van der, Vecht, U., Houwers, D.J. (1985). Vet. Quarter., 7: 112-119.
7. SAS, 1989 SAS Institute Inc., SAS/STAT®. User's Guide, version 6, fourth edition, volume 2, Cary, NC:SAS Institute INC. 846 pp.
8. Smith M.C., Cutlip R.C. (1988) J.A.V.M.A., 193: 63-67.

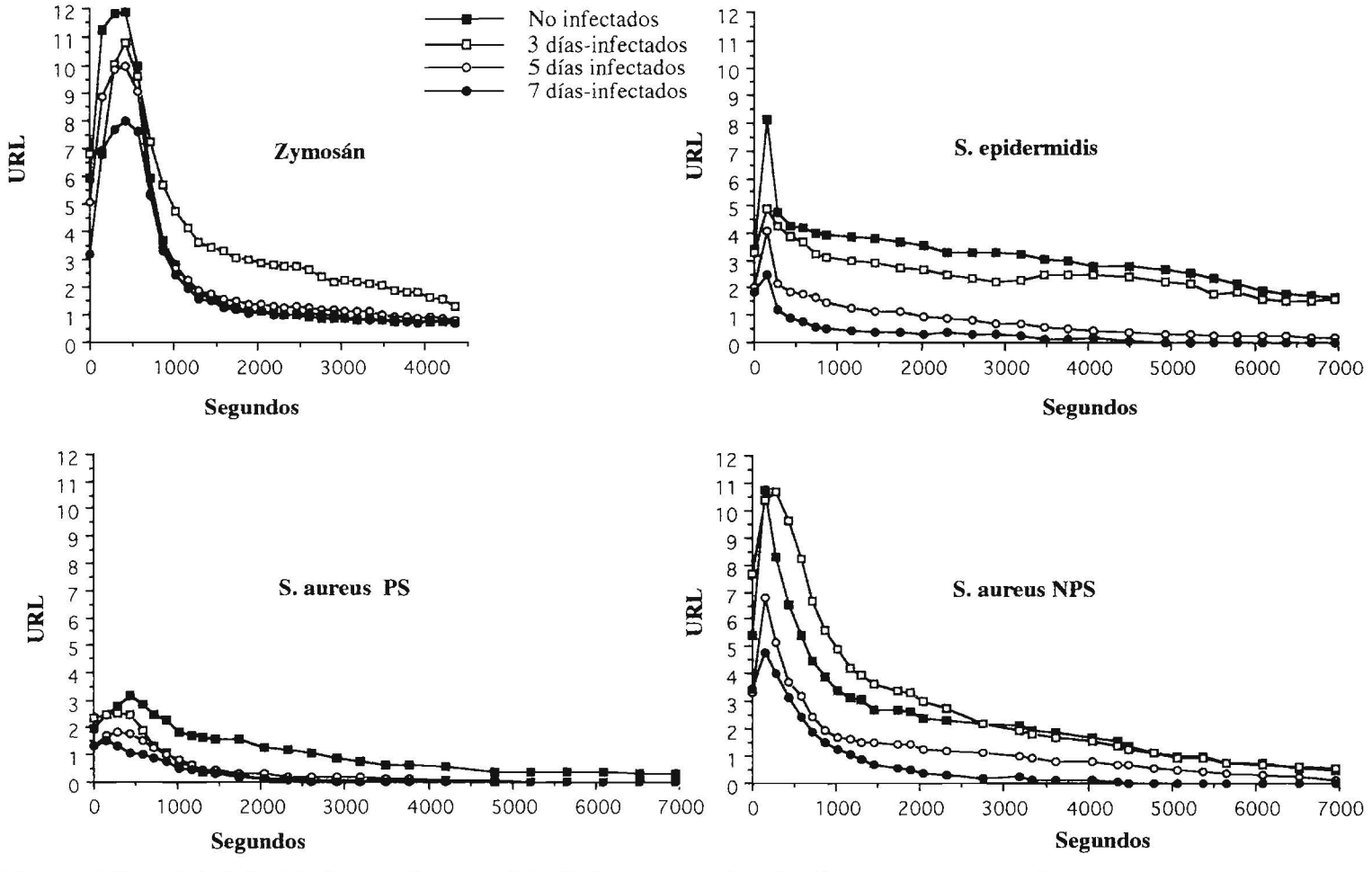


Figura 1. Efecto de la infección de macrófagos por Maedi visna sobre la fagocitosis de tres cepas de estafilococos y de zymosán . PS = productora de slime; NPS = No productora de slime; URL = Unidades relativas de luz tras la hidrólisis de ATP.