CARGA VÍRICA, VALORES ELISA Y PROPORCIÓN DE GAMMA-GLOBULINA EN CALOSTRO DE MADRES INFECTADAS POR EL VIRUS MAEDI VISNA OVINO

S. Andrés[1], I. Glaria[1], A. Fernández[3], R. Reina[1], X. de Andrés[1], J. M. Pérez de la Lastra[1], E. Berriatua[2], M. Daltabuit[2], V. Alvarez[2], L. Luján[3], E. Biescas[3], M. M. Pérez[3], B. Amorena[1], D. de Andrés [1]

[1]CITA (DGA) Av. Montañana 930, 50059 Zaragoza e Instituto de Agrobiotecnología, CSIC-UPNA, Ctra. Mutilva Baja, 31192 Mutilva Baja, Navarra; [2]Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER), Sanidad Animal, 48160 Derio, Vizcaya; [3]Dpto. de Patología Animal, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza

INTRODUCCIÓN

La detección del virus Maedi Visna (VMV) ovino por PCR a partir de DNA de monocitos/macrófagos, sus células diana, presenta dificultades, pues la proporción de monocitos en sangre así como el número de copias de DNA de VMV por monocito sanguíneo en ovinos infectados son reducidos (Carey y Dalziel, 1993). Sin embargo, en calostro, los macrófagos (y restos de células infectadas apoptóticas o descamadas) son más abundantes y puede detectarse DNA proviral con mayor probabilidad. Por otro lado, en distintas especies incluyendo la ovina, existe una elevada concentración de IgG en calostro, y sería de interés averiguar si este isotipo permite distinguir las hembras infectadas de las no infectadas. Los resultados obtenidos en este estudio aportan información sobre la utilidad del calostro en el diagnóstico del VMV mediante cuantificación de secuencias víricas por PCR en tiempo real (RTA-PCR) y determinación de anticuerpos específicos mediante ELISA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Origen y preparación de muestras. Se utilizaron madres de la raza Rasa Aragonesa, 20 seropositivas al VMV y 10 seronegativas. En las 30 madres, se obtuvo calostro-leche a las 24 y 48 h para análisis ELISA y RTA-PCR. En 13 de estas muestras de calostro de 24h se determinó la proporción de gamma-globulinas. En el estudio de sangre, se analizó por ELISA suero de madres y corderos a 1, 2 y 30 días post-parto, y por PCR el DNA de leucocitos mononucleados (PBMC) de madres seropositivas y 12 de sus corderos 1 día tras el parto. Los PBMC se aislaron por flotación (Ficoll-Hypaque, d = 1,077; Lymphoprep Asix-Shield) a partir de sangre con EDTA tripotásico. El DNA se preparó con el kit QUIAamp blood (Qiagen).

ELISA. Se analizó la positividad al VMV con el ELISA Elitest (Hyphen-Biomed), en el que los valores ELISA se definen como A_{450}/cutt-off, siendo positivos a partir de 1.

PCR. El VMV en sangre se detectó por PCR de la región Pol (C. Woodall, Universidad de Edimburgo, comunicación personal; Tolari *et al*., 2000), según el método semi-anidado puesto a punto por nuestro grupo. La RTA-PCR de la región Gag-p25 se realizó según D. Klein (Universidad de Viena; comunicación personal) pero con cebadores diseñados en nuestro laboratorio para este estudio.

Electroforesis de calostro. El lactosuero, obtenido tras dos centrifugaciones a 4000 $\times$ *g* (15 min), se sometió a electroforesis en tiras (2,5 × 14 cm) de cellogel (Biosystems) a 200 V y 30 min (3 mA/tira). El porcentaje de gamma-globulinas en la muestra de calostro se determinó por foto-densitometría (Shimadzu CS-9000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados en calostro/leche (24-48 h post-parto) indican que las madres seronegativas fueron también negativas en RTA-PCR. En madres ELISA positivas (Tabla 1), el ADN proviral se logró detectar (y cuantificar) por RTA-PCR en 16 de las 20 muestras de calostro estudiadas, no hallándose relación entre la carga vírica y los valores ELISA. Sólo un 50 por ciento de las madres fueron PCR-positivas en sangre en este estadio (24-48 h post-parto). Los corderos PCR-positivos siempre procedieron de madres RTA-PCR o PCR (Pol)-positivas, excepto el de una oveja (nº 5056) seropositiva y PCR negativa en calostro y sangre. En corderos, la positividad a la PCR y el valor ELISA tampoco estuvieron relacionados. Dicho valor fue menor que el del suero de la madre, y disminuyó con frecuencia durante el primer mes de vida. La PCR detecta el genoma vírico y el ELISA la respuesta inmune, lo que explicaría la ausencia de relación observada entre la carga vírica y los anticuerpos presentes en un mismo tejido y momento de la vida del animal.

Tabla 1. Estudio de madres seropositivas y sus corderos: Valores ELISA y carga vírica (número de copias de DNA proviral, detectadas por RTA-PCR de la región Gag) en calostro materno, presencia de virus en sangre de madres y corderos (detectada por PCR de la región Pol), y valores ELISA en suero de corderos y en leche de madres.

Nº de oveja	Valor medio ELISA en calostro (24-48h post-parto)	DNA proviral en madres 24-48h post-parto		DNA proviral (PCR) y valores ELISA en sangre de corderos de distintas edades			Valor ELISA en leche (1 mes post-parto)
		RTA-PCR[1] en calostro	PCR[2] en sangre	PCR[2] (días)	Valor ELISA 1-2 días	Valor ELISA 30 días	
1071	6,7	+	+	+ (1)	4,6	2,9	3,0
2026	9,5	+	+	- (1-105)	6,8	6,9	7,4
3005	6,5	+++	débil				
3006	9,0	-	débil				
4036	5,33	+++	+				
5016	8,2	+	débil				
5036	10	++	-	+ (1)	7,0	6,0	
5056	7,6	-	-	+ (2, 4, 30)	6,1	3,0	1,4
5070	7,5	+	+				
5077	7,7	-	-				
5106	9,9	+	-	+ (33)	4,4	1,9	3,7
6011	5,2	+	débil	+ (2)	1,9	1,0	3,1
6788	9,45	-	+	+ (2)	7,2	6,3	6,0
7215	12,1	+	-				
7216	7,7	+++	+	+ (2, 30)	5,4	1,0	2,4
7232	7,6	+	-				
7250	5,7	+	-	- (1-150)	2,9	0,2	2
7254	5,9	+	-	- (1-150)	6,7	3,4	4,9
8226	9,5	+++	-	+ (2, 30)	5,5	4,5	4,2
9042	9,8	+++	-	- (1-150)	5,2	7,3	9,1

[1] RTA-PCR en calostro recogido 24 h post-parto: -, por debajo del límite de detección; +, menos de 50 moléculas; ++, entre 50 y 600 moléculas; +++, más de 600 moléculas.

[2] PCR en PBMC de sangre: +, reacción fuerte; débil, reacción débil; -, ausencia de reacción.

Las casillas en blanco indican muestra no disponible para análisis.

Al determinar la proporción (porcentaje) de gammaglobulinas en calostro (Tabla 2), las muestras de madres seronegativas (excepto la oveja 5020) mostraban una proporción creciente según aumentaba el valor ELISA en calostro, por lo que ambos parámetros estaban positivamente asociados ($r = 0,74$; $P < 0,05$). Sin embargo, no se observó asociación positiva en madres seropositivas. Tampoco se observó asociación entre la proporción de gamma-globulina en calostro y los valores de ELISA en suero en ninguno de los grupos de madres (seropositivas o seronegativas). Todas las madres infectadas presentaron un valor ELISA en calostro > 4, aunque en suero presentaran un valor pequeño (por ejemplo, la oveja 7216). El transporte activo de anticuerpos al calostro puede ir en detrimento de su concentración en suero.

Tabla 2. Porcentaje de gamma-globulina, beta-globulina y albúmina (detectado por densitometría tras electroforesis) en calostro de 24 h en las madres libres y las infectadas por VMV, y valores ELISA en suero y calostro a las 24 h post-parto.

Grupo de madres	Nº de oveja	ELISA en suero (medias)	ELISA en calostro (medias)	Porcentaje en calostro		
				γ-globulina	α- y β-globulina	Albúmina
No infectadas por VMV	0325	0,3	0,3	20,4	65,9	13,7
	5020	0,3	0,5	45,3	50,3	4,4
	3018	0,2	1,4	32,1	62,5	5,4
	3118	0,1	1,7	38	55,5	6,4
	3140	0,1	2,2	43	50,7	6,2
	9040	0,2	2,9	46,7	50	3,3
	6012	0,4	3,0	61,3	34	4,7
Infectadas por VMV	7250	1,0	4,5	49	46,1	4,9
	6011	3,2	5,4	41,7	51,5	6,8
	8508	7,2	5,6	52,8	41,6	5,6
	7254	5,3	5,9	57,4	38,7	3,9
	1071	4,6	7,8	47,5	48,5	4
	7216	2,0	10,4	27	65	8

REFERENCIAS

Carey N. y Dalziel R.G. 1993. *Brit Vet J* 149: 437-454;
Dr. Dieter Klein (Universidad de Viena, comunicación personal);
Tolari F. *et al.*, 2000. *International Conference on Animal Retroviruses*, vol 1. Queen's College, Cambridge, U.K. p. 61.

AGRADECIMIENTOS

Financiado por CICYT AGL2003-08977-C03-01, EU QLK2-CT-2002-00617 y EU LIFE-CRAF-1999-70356). A la Dra S. Hervás-Stubbs por su contribución a la puesta a punto de la PCR de Pol. a ANGRA, al personal del CITA, F. Lahoz, E. Echegoyen y E. Morago por el cuidado de los animales y su colaboración en la extracción de muestras para este estudio.