CORRESPONDENCIA ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DEL VIRUS Y LA PATOLOGÍA OVINA ENCONTRADA EN INFECCIONES POR LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES ESPAÑOLES

Reina, R.[1], Glaria, I.[1], Benavides, J.[2], Biescas, E.[3], Crespo, H.[1], Lucas, N.[1], de Andrés, X.[1], Ramírez, H.[1], Pérez, M.M.[3], Ciriza, J.[1], Contreras, A.[4], Pérez, V.[2], Luján, L.[3], Badiola, J.J.[3], Amorena, B.[1], de Andrés, D.[1]

1. Instituto de Agrobiotecnología. Campus de Arrosadía. 31192 Mutilva Baja. Navarra. 2. Dpto. de Patología Animal. Facultad de Veterinaria. Campus de Vegazana s/n. Universidad de León. 24071 León. 3. Dpto. de Patología Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. Miguel Servet, 177. 50013 Zaragoza. 4. Dpto. de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Campus de Espinardo. Universidad de Murcia. 30071 Espinardo. Murcia.

INTRODUCCIÓN

En el ganado ovino español afectado por la enfermedad causada por los lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR), las formas clínicas más frecuentemente encontradas han sido hasta hace pocos años la mamaria, la pulmonar o ambas conjuntamente, que constituyen la afección conocida como Maedi. Más recientemente, han aparecido dos brotes con formas diferentes de la enfermedad. Uno de ellos, afectando a un elevado número de ovinos Assaf de Castilla y León, presenta la forma nerviosa, o Visna (Benavides *et al*., 2006), poco frecuente en Europa, y que de forma esporádica se ha detectado en caprinos jóvenes infectados por LVPR. El segundo brote, restringido a un rebaño Rasa Aragonesa de Aragón (Luján *et al*., 2005), presenta una afección articular, más frecuente en ganado caprino. El objeto de este estudio es determinar si los virus implicados en las distintas patologías encontradas en España, incluyendo las de ambos brotes, presentan unas características genéticas diferentes entre sí y si se hallan genéticamente más cercanos a los LVPR prototipo aislados de caprinos (virus de la artritis encefalitis caprina, VAEC) o a los procedentes de ovino (virus del Maedi Visna, VMV), en el contexto de la clasificación general en clados (A - D) propuesta por Shah *et al*. (2004).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevó a cabo una amplificación de secuencias de LVPR de ovinos con las formas clínicas nerviosa (de raza Assaf, aislado 698) y artrítica (de raza Rasa Aragonesa, aislado 496), así como de ovinos de raza Latxa Navarra (aislados Ov1, Ov5 y Ov8) y caprinos de raza Murciano-Granadina (aislados C1, C3 y C4), seropositivos sin cuadro clínico. Las condiciones generales de la PCR fueron: 1 µg de DNA por reacción, tampón 1X (Biotools), 2 mM de Cl_2 Mg (Biotools), 225 µM de cada dNTP (Biotools), 20 pmol de cada cebador y 0,8 U Pfu de Taq DNA polymerasa (Invitrogen) en un volumen final de 20 µl. Se amplificaron las regiones: pol (~1200 nucleótidos, nt) utilizando la metodología de PCR anidada y los cebadores descritos por Shah *et al*. (2004); LTR (~300 nt), según el procedimiento descrito por Extramiana *et al*. (2002) con cebadores de Sonigo *et al*. (1985); y gag-p25 (~550 nt) según el procedimiento y cebadores descrito en Reina *et al*. (2006).

Además de las secuencias de aislados españoles obtenidos en este trabajo, se utilizaron en los alineamientos secuencias procedentes del GenBank tales como EV1 (S51392, del Reino Unido), KV1514 (M60610, de Islandia), SA-OMVV (M31646, de Sudáfrica) y USA85-34 (AY101611, de USA) como secuencias completas de SRLV ovinos; CAEV-Co (M33677, de USA), CAEV-Gansu (AY900630, de China) y CAEV1GA (AF322109, de Noruega) como secuencias completas de SRLV caprinos, y secuencias de SRLV de ovinos y caprinos suizos utilizadas por Shah *et al*. (2004) para establecer la actual clasificación de LVPR en clados (A_1 –A_7 , B_1, B_2, C y D).

Las secuencias de nt se analizaron y editaron con el programa BioEdit (Hall, 1999). Los alineamientos múltiples y la matriz de distancia de nt para los estudios filogenéticos se realizaron con el programa bioinformático ClustalX (Thompson *et al*., 1994). Los árboles filogenéticos (cladogramas) se produjeron a continuación por el método de Neighbour

Joining, con la corrección de Kimura's (Saitou y Nei, 1987). Los límites de confianza estadística de la topología del cladograma se determinaron con 1000 bootstraps. Para editar y visualizar los cladogramas se utilizó el programa TREEVIEW 1.3 (Page, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis genético de las regiones *pol* y LTR (Fig. 1) y *gag-pol* y *gag-p25* (resultados no mostrados) demostró una coherencia entre los hallazgos de estas tres regiones del genoma vírico. Así, el aislado 496, incluido en el clado B_2, se situaba más cercano a la estirpe tipo de VAEC (CAEV-Co, clado B_1) responsable de cuadros artríticos (en caprinos), como correspondería al hecho de proceder de un individuo con patología artrítica (aunque se trate de un ovino), que a las secuencias de SRLV de ovinos españoles con patología nerviosa (698) o procedentes de rebaños con patología pulmonar y mamaria (Ov1, Ov5 y Ov8). Por otra parte todas las restantes secuencias utilizadas en los alineamientos, exceptuando las de los clados B y C (incluida la de 496), presentaban una deleción de 6 nucleótidos (correspondientes a dos glicinas) en *gag-p25* (resultados no mostrados), confirmando la naturaleza VAEC del aislado 496.

En cambio, las secuencias *pol* del aislado español del brote nervioso, 698, se asociaban al clado A_5, junto con Ov8, C1 y C3. Los árboles filogenéticos a partir de las secuencias *gag-pol* y *gag-p25* (resultados no mostrados), no producían una asociación tan precisa del aislado 698, situándolo únicamente dentro de lo clados A. Conviene señalar que hasta ahora, las secuencias de LVPR formando los clados A incluyen todas las estirpes tipo Maedi Visna (EV1, KV1514, SAOMVV, USA85-34, …) procedentes de ovinos, junto a aislados de origen ovino o caprino (Shah *et al*., 2004).

Además, la secuencia de nucleótidos en la región LTR en ambos aislados confirma los hallazgos anteriores: 496 agrupado con CAEV-Co y CAEV-Gansu, mientras que 698, junto a Ov1, Ov5, Ov8, C1, C3 y C4, agrupado con los prototipos de Maedi Visna.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benavides et al. 2006. Veterinary Record, 158: 230-35.
- Luján et al. 2005. Proc.23rd Meeting ESVP p112 .
- Shah *et al.* 2004. Virology, 319: 12–26.
- Extramiana *et al*. 2002. Small Ruminant Research, 44: 109-17.
- Sonigo *et al*. 1985. Cell, 42: 369-82.
- Reina et al. 2006. Virus Research, 121(2):189-98.
- Hall.1999. Nucleic Acids Symposium Ser. 41: 95-98.
- Thompson *et al.* 1994. Nucleic Acids Research, 22: 4673-80.
- Saitou y Nei. 1987. Molecular Biology and Evolution, 4: 406-25.
- Page. 1996. Computer Applications in the Biosciences, 12: 357-8.

AGRADECIMIENTOS

Financiado por CICYT AGL2006-13410-C06-01/GAN y Consejería de Industria del Gobierno de Navarra IIQ010449.RI1. R. Reina es becario Posdoctoral de la UPNA; J. Benavides es becario FPI; E. Biescas ha sido becaria FPI; H. Crespo es becaria I3P de Posgrado; X. de Andrés es becaria FPI; H. Ramírez es becario Predoctoral de la UPNA.

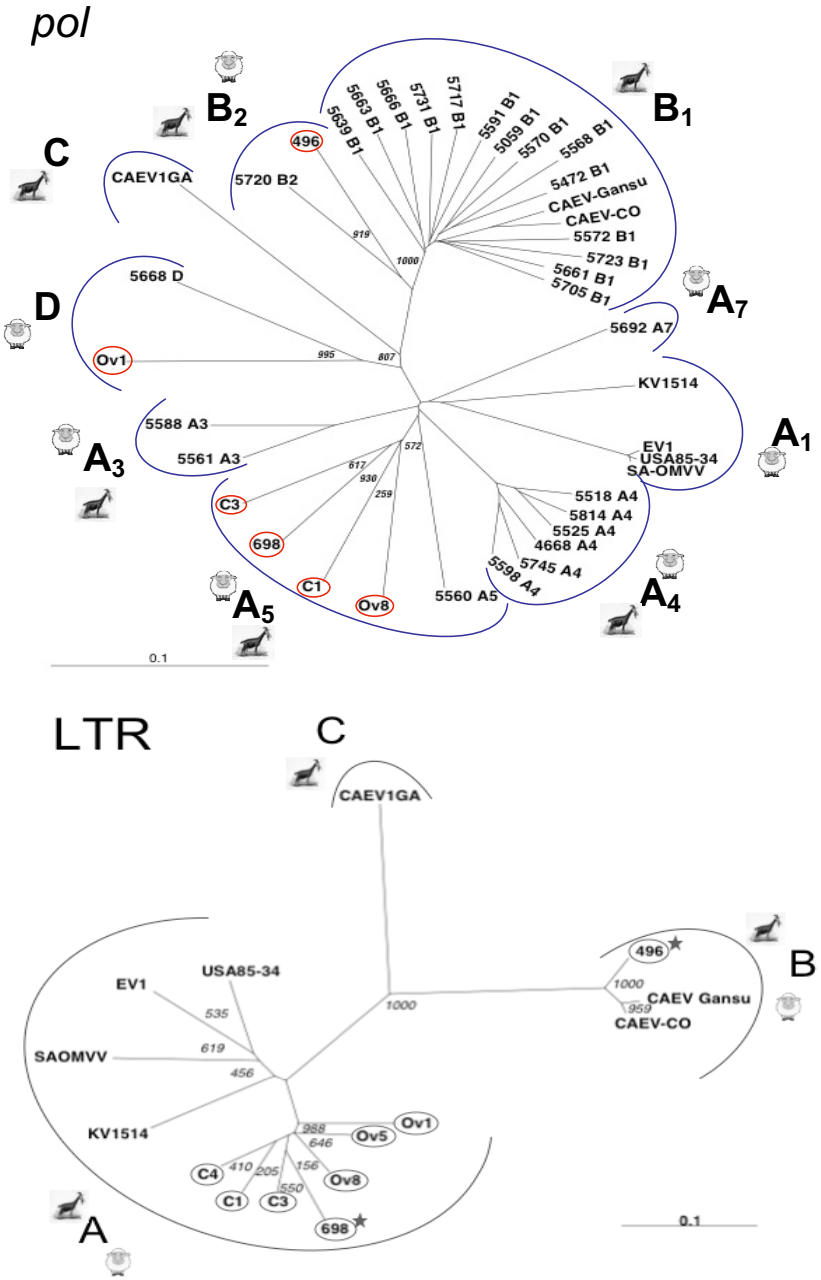


Figura 1. Cladogramas mostrando la distribución de los aislados españoles entre los distintos clados reconocidos. Se emplearon las secuencias de nucleótidos de las regiones *pol* y LTR de: aislados españoles de LVPR procedentes de ovinos con cuadro nervioso (698) o articular (496) y de ovinos (Ov1, Ov5, Ov8) y caprinos (C1, C3, C4) seropositivos asintomáticos; estirpes prototipo (GenBank) de LVPR ovinos (EV1, SAOMVV, KV1514, USA85-34) y caprinos (CAEV-CO, CAEV-Gansu y CAEV1GA); y aislados de LVPR de ovinos y caprinos suizos (Shah *et al*., 2004). Los números en cursiva indican los "bootstraps".