

## ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DEL RETROVIRUS DEL JAAGSIEKTE EN TEJIDOS Y CÉLULAS SANGUÍNEAS DE OVEJAS AFECTADAS POR LAS FORMAS CLÁSICA Y ATÍPICA DE LA ADENOMATOSIS PULMONAR OVINA

M. GARCÍA <sup>1</sup>; N.CORTABARRIA <sup>1</sup>; C. COUSENS <sup>2</sup>; B.EXTRAMIANA <sup>1</sup>; R.A. JUSTE <sup>1</sup>; E. MINGUIJÓN <sup>3</sup>; A.ORTÍN <sup>3</sup>; M. DE LAS HERAS <sup>3</sup>; M. SHARP <sup>2</sup> y L. GONZÁLEZ <sup>2\*</sup>.

<sup>1</sup>NEIKER. Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (SIMA). Berreaga, 1. 48160 Derio. Vizcaya (España).

<sup>2</sup> Moredun Research Institute. Pentland Science Park. Bush Loan. Penicuik. EH 26 OPZ Edinburgo. (Gran Bretaña).

<sup>3</sup> Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria. Departamento de Patología Animal. Miguel Servet 133, 50013 Zaragoza (España). \*Dirección actual: <sup>2</sup>.

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo es establecer la extensión de la diseminación del JSRV (retrovirus del Jaagsiekte) en animales con formas adenomatosas clásicas y atípicas.

Se empleó una PCR LTR semianidada para detectar el ADN proviral, exógeno específico de JSRV, en células sanguíneas y tejidos en 36 ovejas. Estas se clasificaron como: 1.- Animales afectados de APO (adenomatosis pulmonar ovina), clásica (n= 10). 2.- Ovejas afectadas de la forma atípica (n=6). 3.- No afectadas procedentes de rebaños con casos de APO (n=10). 4.- No afectados de rebaños libres de APO.

Todas las muestras del grupo 4 fueron negativas. El ADN proviral fue detectado en todos los pulmones de los animales afectados en los grupos 1 y 2 y también en una alta proporción en muestras de tejido linfóide y células sanguíneas, mientras que en glándula mamaria y sistema nervioso central los resultados fueron negativos. Dieron positivos células sanguíneas y de tejido linfóide algunos animales del grupo 3.

Se realizó una comparación de PCR, una directa y otra semianidada en más de 90 muestras seleccionadas de las estudiadas anteriormente. Ambos protocolos resultaron similares, aunque las ventajas resultan remarcables en la técnica directa por costo, tiempo de realización y disminución de problemas de contaminación.

**Palabras clave:** PCR -directa y semianidada, diagnóstico, patogenicia.

### INTRODUCCIÓN

El Jaagsiekte es una enfermedad tumoral que se desarrolla en pulmón y que puede frecuentemente metastatizar a ganglios mediastínicos, siendo descritas de forma casual en órganos y sistemas distintos al respiratorio. Afecta a ovinos y en menor proporción a caprinos, aunque es conocida en otras especies animales de una manera excepcional. Etiológicamente es un retrovirus ARN de tipo B o D el que se integra dentro del genoma del animal en forma proviral. Se han estudiado secuencias muy

similares endógenas que se diferencian en pocos pares de bases de las que producen la enfermedad. Este cáncer ha sido denominado, entre otras muchas definiciones, como un adenocarcinoma broncoalveolar y las células predominantes que se reconocen son los neumocitos tipo I y II, formadores del material surfactante que evita el colapso alveolar.

En este estudio y a efectos prácticos se diferencian formas extremas que se denominan clásicas y atípicas.

La primera es aquella en la que, independientemente de su extensión, se encuentra una formación de aspecto tumoral, que a la sección es húmeda, de color grisáceo y aspecto glandular en el que se describen con frecuencia límites atelectásicos continuados con un enfisema compensatorio más aclarado. Es posible encontrar pequeños nodulillos satélite en las zonas limítrofes de similar aspecto, color y forma que la masa tumoral. Su situación es craneo-ventral y de allí evolucionan hacia situaciones más caudales y dorsales. Las formas atípicas, por contra, que se encuentran situadas más frecuentemente en los lóbulos dorsales y caudales, suelen ser nódulos únicos, de aspecto retraído y un poco deprimidos, con forma estrellada. Tienen un color blanco y la superficie de corte es seca. Microscópicamente, ambas formas son muy similares, aunque el componente fibrótico, en la forma atípica es mayor.

La forma clásica, ampliamente extendida y que es la tradicionalmente reconocida, es una forma que provoca importantes pérdidas económicas derivadas de la muerte del animal, cuidados veterinarios y del ganadero, disminución de la producción, etc. Por otra parte la forma atípica suele ser solamente un hallazgo de necropsia sin efectos evidentes en la salud y la productividad de los animales que la presentan.

La clínica varía según el estadio de enfermedad en el que se encuentre el ovino. Esta es muy evidente en las últimas fases del proceso, encontrándose animales caquéticos y con una disfunción respiratoria muy evidente. Existe una estrecha relación entre esta patología respiratoria y otras de tipo bacteriano y viral de gran interés sanitario, como es el Maedi-Visna. Por otro lado, este virus no desarrolla reacción inmune. Esta parece no existir, o al menos los protocolos que hasta la fecha se han desarrollado, no han sido lo suficientemente sensibles para lograr detectar esa reacción. Si esto resulta interesante, también lo es el hecho de que todos los intentos por cultivar este virus en medios celulares "in vitro" han sido fallidos. En la actualidad no existe un método de diagnóstico "in vivo", en animales infectados asintomáticos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio fueron seleccionadas 10 explotaciones de ovino de raza Latxa situadas en las distintas provincias de la Comunidad Autónoma Vasca. Los animales de este estudio no fueron recogidos

exclusivamente por padecer una patología respiratoria clara. Estos se dividieron en distintos grupos dependiendo de dos premisas. Una, la situación del rebaño de origen con respecto a su incidencia de APO y en segundo lugar, las lesiones adenomatosas encontradas en cada uno de los animales. Por tanto fueron cuatro los grupos a estudiar: 1.- Animales con APO clásica (n=10). 2.- Casos con APO atípica (n=6). 3.- Ovinos no afectados procedentes de rebaños con casos de APO (n=10). 4.- No afectados, de rebaños libres de la enfermedad.

Los animales fueron sacrificados y de ellos se procesaron los siguientes tejidos: sistema nervioso central, ubre, riñón, epitelio nasal, pulmón no tumoral, pulmón tumoral, ganglio mediastínico, ganglio retromamario, bazo y además se tomó sangre en tubos con heparina para su posteriormente procesamiento con objeto de extraer las células blancas sanguíneas periféricas.

El virus del Jaagsiekte (JSRV) es ARN y se integra dentro del genoma ovino en forma proviral. Con el fin de analizar este, se realizó la extracción del ADN de los órganos mencionados. Esta se realizó mediante el método clásico del fenol-cloroformo-isoamílico y lavados sucesivos con alcoholes de distintas purezas, previa digestión con proteinasa K.

Una vez obtenido este ADN, se aplicó la técnica de la PCR (polimerasa chain reaction), basada en la amplificación de una secuencia específica propia del virus exógeno. En nuestro caso, para el estudio de distribución en tejidos, se empleó una secuencia que se encuentra en la región U3 del área LTR, una de las zonas más conservadas de los retrovirus. Para ello, se empleó una técnica de PCR semianidada, en dos pasos. En una primera ronda se utilizaron un par de cebadores cuyo producto se empleó en la segunda amplificación, en la cual se usó otro par de cebadores uno de ellos distinto, que amplificó una secuencia interior de este primer producto. Cada una de las muestras de cada tejido de cada animal se realizó por seis veces. Los productos de amplificación de la primera ronda dan un tamaño de 176 pb y 133 pb en la segunda.

Otra de las pruebas realizadas fue la comparación de esta PCR semianidada, empleada en la realización del estudio de distribución en tejidos, con otra PCR en un sólo paso en la que se modificaron condiciones de temperaturas de termociclado y se cambió la enzima polimerasa. En total se examinaron 96 muestras de ADN procedentes de diferentes tejidos de animales pertenecientes a distintos grupos de animales de estudio. En la PCR directa se utilizaron igualmente 6 repeticiones por muestra.

## RESULTADOS

### 1.- Distribución del provirus del JSRV por la U3-Hn-PCR

Los resultados de la distribución del provirus del JSRV en las muestras analizadas por esta PCR semianidada se muestran en la tabla 1.

Por grupos es de destacar que en los animales estudiados con APO clásica el provirus se detecta siempre en las células blancas, ganglio mediastínico y en los pulmones, tumoral y normal (aquel en el que macroscópicamente no se detecta ningún nódulo canceroso). Se dan resultados positivos aunque en una proporción mucho menor en órganos linfoides como ganglio retromamario y bazo así como en riñón y epitelio nasal.

En el grupo 2.- Animales con APO atípica, se reseña que el número de muestras es menor, ya que la proporción de animales encontrados con esta forma eran excepcionales. Se halla clara positividad en las muestras de pulmón ya sea tumoral o no, así como en ganglio mediastínico. En células blancas es importante la proporción de resultados positivos.

En los animales en contacto con la enfermedad, la positividad encontrada es muy rara y esta cuando se da, es débil (número de replicas positivas sobre el total de las estudiadas, en este caso 6). Es interesante comprobar que existe detección del provirus en células blancas sanguíneas.

En el caso de los animales exentos de la patología, procedentes de rebaños libres de la enfermedad, no se detectó ningún animal ni muestra alguna positiva.

**Tabla 1. Detección del provirus del JSRV por U3- Hn- PCR.**

TEJIDO	APO CLÁSICA	APO ATÍPICA	EN CONTACTO	SANOS
SNC	0/9	0/6	0/6	0/10
UB	0/10	0/6	0/6	0/10
RÑ	2/10	0/6	0/1	0/3
EN	3/8	NH	NH	NH
PnoT	10/10	3/5	1/10	0/10
PT	10/10	4/4	NH	NH
GM	10/10	5/6	2/10	0/8
GR	5/10	0/6	1/9	0/10
BZ	4/10	0/6	2/10	0/10
CBSPs	10/10	3/4	4/10	0/10

NH (No hecho), sistema nervioso central (SNC), ubre (UB), riñón (RÑ), epitelio nasal (EN), pulmón no tumoral (PnoT), pulmón tumoral (PT), ganglio mediastínico (GM), ganglio retromamario (GR), bazo (BZ) y células blancas sanguíneas periféricas (CBSPs).

### 2.- Estudio comparativo de las PCRs semianidada y directa.

Con la PCR directa se detectaron 38 muestras positivas de las 46 muestras positivas identificadas con la variante optimizada lo que representa una sensibilidad del 83%. Además se obtuvo un resultado positivo de una muestra negativa en la PCR-

SA, lo que equivale un 98% de especificidad. El procesado con esta nueva PCR requiere un 50% de reactivos y tiempo.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en ambos tipos de presentación confirman una etiología común. En consecuencia podría plantearse que ambas formas no son sino manifestaciones externas de distintos grados de delimitación de la infección en el sentido de que en las formas clásicas el virus sería capaz de encontrarse en una mayor variedad de tejidos así

como de alcanzar una mayor extensión en el pulmón. En las formas atípicas o nodulares la replicación del virus se encuentra más restringida por el hospedador, de manera que no solo sería más difícil detectar virus en tejidos sino que el crecimiento tumoral se vería mucho más delimitado por factores individuales como resistencia racial, dosis infectante, momento de infección, etc para que se dea-rollase un tipo u otro.

Uno de los resultados más interesantes de este estudio es la confirmación de la posibilidad de detección de ADN proviral en células sanguíneas de animales asintomáticos y aparentemente sanos. Se abre una puerta interesante para la detección de animales clínicamente sanos como posible método de diagnóstico y control de la infección, en áreas libres de la enfermedad, especialmente en cuanto que puede sanear o prevenir la entrada de la infección en rebaños de alto valor genético.

### CONCLUSIONES

El provirus de la adenomatosis pulmonar ovina se encontró más extendido en los tejidos de los animales afectados por las formas clásicas de la APO que en los que presentan las formas atípicas.

Los órganos más inténsamente infectados, son el pulmón tumoral y no tumoral, y el ganglio mediastínico. La mayoría de las células blancas sanguíneas fueron positivas en animales afectados con APO clásica y atípica.

En algunos animales en contacto, las células blancas sanguíneas, los órganos linfoides, y el pulmón también mostraron positividad aunque con menor intensidad y proporción.

En ningún caso se encontró positividad en animales sanos.

La PCR directa puede considerarse como la técnica de elección para la detección del ADN proviral, por su sensibilidad y especificidad, rapidez y menor costo.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DUALDE- PEREZ, D. 1969. La adenomatosis pulmonar ovina en España. *Tesis doctoral*. Universidad de Zaragoza, 1-165.
- ROSADIO, R. H., SHARP, J. M., LAIRMORE, M.D., DAHLBERG, J. E. AND DE MARTINI, J. C. 1988. Lesions and retroviruses associated with naturally occurring ovine pulmonary carcinoma (sheep pulmonary adenomatosis). *Vet. Pathol.* 25: 58- 66.
- PALMARINI, M., COUSENS, C., DALZIEL R.G., BAI, J STEDMAN, K., DE MARTINI, J. C. AND SHARP, J. M. 1996. The exogenous form of Jaagsiekte retrovirus is specifically associated with a contagious lung cancer of sheep. *J. Virol.* 70(3): 1618- 1623.
- SHARP, J. M. AND ANGUS, K. W. 1990. Sheep pulmonary adenomatosis: studies of its aetiology. *Maedi- Visna and related diseases*. Petrusson. Netherlands.
- PALMARINI, M., DEWARD, P., DE LAS HERAS, M., INGLIS, N.F., DALZIEL R.G. AND SHARP, J. M. 1995 Epithelial tumour cells in the lungs of sheep with pulmonary adenomatosis are major sites of replication for Jaagsiekte retrovirus. *J. Gen. Virol.* 76: 2731- 2737.
- GONZALEZ, L., JUSTE, R. A., CUERVO, L. A., IDIGORAS, I, AND SAEZ DE OCARIZ, C. 1993. Pathological and epidemiological aspects of the coexistence of Maedi- Visna and sheep pulmonary adenomatosis. *Res. Vet. Sci.* 54: 140-146.