

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE SRLV EN EL MEDITERRÁNEO

Lorena de Pablo-Maiso¹, Carmen Gómez-Arrebola¹, Luigi Bertolotti², Sergio Rosati², Ricard Farriols³, Damián de Andrés Cara¹, Ramsés Reina¹

¹Instituto de Agrobiotecnología. CSIC - UPNA - Gobierno de Navarra. Avda. Pamplona 123, Mutilva (Navarra). ²Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Torino.

³Veterinario, DVM. lorena.depablo@unavarra.es

INTRODUCCIÓN

Los virus visna maedi (VMV) y de la artritis encefalitis caprina (CAEV) forman un único grupo denominado Lentivirus de Pequeños Rumiantes (Small Ruminant Lentiviruses, SRLV) que afecta a ovinos y caprinos (Zanoni, 1998). En Europa, los SRLV son endémicos y su efecto económico es innegable debido a la reducción de la productividad animal, disminución de la fertilidad, del número de corderos, del peso al nacer y en el engorde y de la calidad de la carne (Keen et al., 1997). En España la enfermedad se encuentra ampliamente distribuida y su prevalencia es media alta. La presencia del virus se ha detectado allá donde se ha explorado, estudios que comprenden la zona sur de Navarra y La Rioja (Lujan et al., 1993), Aragón, Euskadi y León indican una amplia distribución de la infección (Minguijon et al., 2015).

Tras las primeras caracterizaciones genéticas, los SRLV actualmente se dividen en 5 grupos genéticos (genotipos del A al E) que difieren hasta aproximadamente en un 40% de su secuencia nucleotídica, basándose en los segmentos largos *gag-pol* de su genoma (Ramirez et al., 2013). Además, dentro de cada genotipo viral se pueden diferenciar subgrupos que difieren en un 15% de su secuencia. Concretamente, los grupos predominantes del genotipo A, estirpes clásicas tipo VMV, se subdividen en 15 (A1-A15) y el grupo B, estirpes de CAEV, en 3 (B1-B3), mientras que el genotipo C aún no presenta subtipos y el E comprende dos subtipos (E1- E2).

Dentro de los genotipos predominantes, el subtipo 3 del genotipo B, el menos heterogéneo, es uno de los últimos que se han descrito y está formado por las estirpes italianas Fonní y Volterra (Bertolotti et al., 2011). Los estudios realizados hasta ahora han mostrado fuertes vínculos epidemiológicos en la cuenca mediterránea. Ejemplos de estos vínculos se proporcionan a partir de los genotipos B y E.

El presente estudio muestra por primera vez la presencia de infección por SRLV en las Islas Baleares debida a estirpes procedentes o bien de brotes descritos en la Península Ibérica (Glaría et al., 2009; Glaría et al., 2012; Pinczowski et al., 2017) o bien circulantes en la isla de Cerdeña (Bertolotti et al., 2011).

El aislamiento geográfico relativo de los sistemas de producción ganadera en zonas como la isla de Mallorca, requiere de una especial vigilancia epidemiológica para evitar la aparición de la enfermedad, en poblaciones animales que se enfrentan a variantes virales exóticas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han analizado un total de 277 animales pertenecientes a distintas explotaciones de la zona este de la isla de Mallorca, se han obtenido muestras de sangre total que tras centrifugación se separaron en plasma y *buffy coat* que se recogió en PBS y se sometió a centrifugación en gradiente de Lymphoprep (d=1,077; Nycomed), para la obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).

Mediante diagnóstico serológico, las muestras de plasma se analizaron con un test comercial (Eradikit Screening, In3Diagnostic) basado en la detección de los anticuerpos reactivos frente a proteínas del core viral, junto con la proteína transmembrana codificadas por distintos genotipos de SRLV. Tras el primer análisis, se analizaron los sueros con otro test (Eradikit Genotyping) capaz de detectar el virus infectante entre los genotipos A, B y E.

Tras la extracción de ADN de los PBMCs, se realizaron reacciones de amplificación con cebadores descritos en la literatura, de la mayoría de los animales incluidos en el estudio serológico. Los amplicones de la talla esperada se purificaron y se clonaron en plásmidos (pJET, Thermo) para su posterior secuenciación (StabVida). Se secuenciaron tres clones empleando el cebador pJETfw (Thermo).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el 82% de los rebaños se encontraron animales seropositivos por lo que al igual que en otras zonas geográficas de nuestro país, la seroprevalencia frente a los SRLV es muy elevada. Intra-rebaño la seroprevalencia varía entre el 9 y el 40%, dentro de los valores descritos en la literatura.

Tras la primera clasificación serológica, empleamos un kit capaz de determinar el genotipo infectante en el animal (ELISA Genotyping) hallando un 5,6% de sueros reactivos frente al genotipo E, un 9% frente al A, un 66% frente al genotipo B y un 18% con resultados positivos no atribuibles a ningún genotipo en concreto o negativos. Los resultados no atribuibles a ningún genotipo podrían corresponder a dobles infecciones. Sin embargo, los negativos reflejan la menor sensibilidad del kit Genotyping en comparación con el Screening que incluye más epitopos. La presencia de genotipo E hasta el momento tan solo se ha descrito en caprinos de Italia, concretamente en la Región Piemonte y en Cerdeña (Reina et al., 2010; Reina et al., 2009). La reacción serológica frente a antígenos del genotipo E en Mallorca podría también indicar la presencia de genotipos divergentes propios de la isla, que guarden cierta similitud con el ancestral genotipo E.

El análisis por PCR indicó la presencia de infección en el 64% de los rebaños incluidos en el análisis. Al igual que con el ELISA, la presencia de animales positivos por PCR intra-rebaño fue inferior. Individualmente la PCR resultó ser menos sensible que el ELISA. La baja carga viral presente en los animales infectados y/o la heterogeneidad de las estirpes circulantes en la zona de unión de los cebadores, pueden explicar esta menor sensibilidad de la PCR. Sin embargo, se detectaron animales positivos entre los seronegativos, por lo que se confirma el valor añadido de la PCR en el diagnóstico de los SRLV.

La secuenciación de las estirpes amplificadas por PCR indicó que al menos los genotipos A y B circulan actualmente en la población ovina de la isla de Mallorca, siendo el genotipo B el predominante en un 80% de las muestras. Dentro del genotipo B el 83% de las secuencias correspondieron al subtipo B3, cuya presencia se había limitado hasta el momento a la isla de Cerdeña (Bertolotti et al., 2011). La comparación con las secuencias B3 descritas en Italia muestra una gran similitud en los epitopos inmunodominantes responsables de la reacción en el ELISA screening. Sin embargo, existen diferencias en otras regiones del genoma indicando una evolución particular en Mallorca que las sitúa en un *cluster* diferenciado. El estudio filogenético ha datado el ancestro común más probable hace 15-20 años. Un estudio en profundidad de los intercambios comerciales entre ambas islas podría esclarecer definitivamente el origen del genotipo B3 en Mallorca.

Aunque presentes en un bajo porcentaje, el estudio de las secuencias halladas pertenecientes a los genotipos A y B2 indicaron la presencia de las estirpes 697 (genotipo A) y Ov496 (genotipo B2) muy probablemente procedentes de los brotes descritos en la península.

Sin duda uno de los factores que moldea la evolución de los virus es el hospedador, frente a todo el abanico filogenético de los SRLV las estirpes del genotipo B3 prevalecen en dos poblaciones ovinas pertenecientes a un tronco genético común.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bertolotti, L., Mazzei, M., Puggioni, G., et al. 2011. *J. Gen Virol.* 92, 1923-1929. • Glaria, I., Reina, R., Crespo, H., et al., 2009. *Veterinary microbiology* 138, 156-162. • Glaria, I., Reina, R., Ramirez, H., et al., 2012. *Veterinary microbiology* 155, 137-146. • Keen, J., Hungerford, L., Littlelike, E., et al., 1997. *Prev Vet Med.* 30, 155-169. • Lujan, L., Begara, I., Collie, D.D., et al., 1993. *Clin Exp Immunol.* 91, 272-276. • Minguíjon, E., Reina, R., Perez, M., et al. 2015. *Veterinary microbiology* 181, 75-89. • Pinczowski, P., Sanjose, L., Gimeno, M., Crespo, H., et al. 2017. *Veterinary pathology.* • Ramirez, H., Reina, R., Amorena, B., et al. 2013. *Viruses* 5, 1175-1207. • Reina, R., Bertolotti, L., Dei Giudici, S., et al. 2010. *Veterinary microbiology* 144, 24-31. • Reina, R., Grego, E., Bertolotti, L. et al. 2009. *Journal of virology* 83, 1152-1155. • Zanon, R.G., 1998. *The Journal of general virology* 79 (Pt 8), 1951-1961.

Agradecimientos: Financiado por el Gobierno de Navarra (LENTIMOL; PI042). Lorena de Pablo es becaria FPI de la UPNA. Carmen Gómez procede del Fondo de Garantía Juvenil

del CSIC. Ramsés Reina es contratado Ramón y Cajal del MINECO. Agradecemos la colaboración de los ganaderos de la isla de Mallorca por su colaboración a lo largo de todo el estudio.

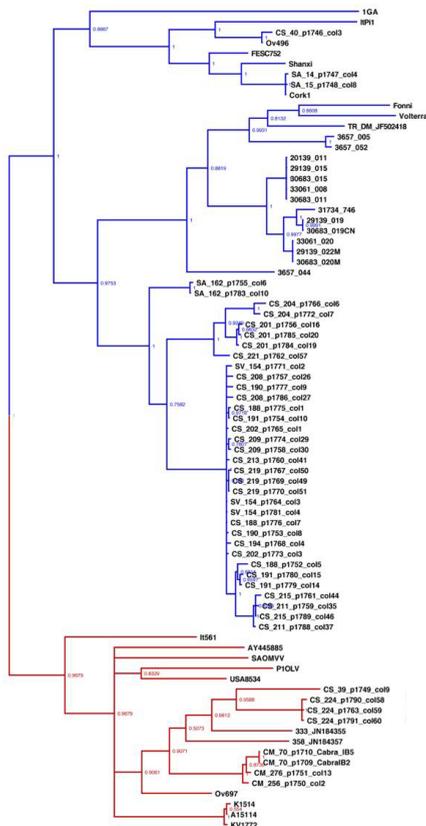


Figura 1. Árbol filogenético en el que se agrupan las nuevas secuencias obtenidas con las descritas en la literatura. En la parte superior se muestran las secuencias del genotipo B (código CS, SA y SV) y en la inferior las del genotipo A (códigos CS y CM).

TITLE: MOLECULAR EPIDEMIOLOGY AND GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION OF SRLV IN THE MEDITERRANEAN

ABSTRACT: The small ruminant lentiviruses (SRLV) include visna maedi (VMV) and caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) and are widely distributed across the world. SRLV are now divided into 5 genotypes (A-E) being genotypes A and B worldwide distributed, whereas genotypes C and E are geographically restricted so far. Serological screening and serotyping of the circulating SRLV strains demonstrated the presence of the infection for the first time in Mallorca Island. PCR and sequencing further confirmed these results and highlighted the prevalent presence of the B3 subgroup only described in Italy until now. The timing of the most recent common ancestor, between B3 sequences from Sardinia and Mallorca islands was 15-20 years ago, indicating a possible transmission likely through animal trade. Similarly, strains previously isolated from arthritis and encephalitis high-impact outbreaks in the Iberian Peninsula were detected in Mallorca. Serological surveillance of incoming animals is essential in controlling SRLV infection in order to avoid the spreading of infection and the disease onset, especially important in an epidemiologically uncharacterized isolated area.

Keywords: Small Ruminant Lentiviruses; Molecular epidemiology; Animal trade; Phylogeny.