

## **DISTRIBUCIÓN DEL VIRUS DE LA LENGUA AZUL EN TEJIDOS DE OVEJAS INFECTADAS DE MANERA NATURAL**

### **BLUETONGUE VIRUS DISTRIBUTION IN TISSUES FROM NATURALLY INFECTED SHEEP**

**L. Espinosa Montalbán**

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de  
Madrid

#### **Resumen**

La lengua azul está causada por un virus ARN bicatenario del género *Orbivirus*. Afecta a óvidos, bóvidos y otros rumiantes y está transmitida por mosquitos del género *Culicoides*. Da lugar a grandes pérdidas económicas. Existe una notable diferencia entre los 24 serotipos distintos existentes del virus. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la distribución del serotipo 1 del virus de la lengua azul mediante la reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa (RT-PCR) en distintos tejidos de ovejas infectadas de manera natural en Andalucía, donde circulan los serotipos 1 y 4. A partir de muestras de distintos tejidos de dichas ovejas, se extrajo el ARN y se realizaron dos ensayos de RT-PCR, uno genérico y otro específico del serotipo 1. Sólo las muestras de sangre de una de las ovejas resultó positiva a ambas técnicas y, al secuenciar el fragmento se correspondió con el serotipo 1. Esto demuestra que la sangre es una buena muestra de elección para la detección de este serotipo. Se están realizando nuevos estudios para determinar con seguridad la eficacia de estas técnicas de RT-PCR.

**Palabras clave:** lengua azul, RT-PCR, serotipo.

#### **Summary**

Bluetongue is caused by an RNA-virus belonging to the *Orbivirus* genus. It affects sheep, cattle and other ruminants and is transmitted by midges from the *Culicoides* genus. It causes important economical losses. There is a notorious difference between the 24 different BTV serotypes. The objective of this study is to analyze the distribution of the Bluetongue virus in different tissues by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for BTV serotype 1 in naturally infected sheep from Andalucía, where serotypes 1 and 4 are present. RNA was extracted from different tissues sample of these sheep and after that, a generic and serotype 1-specific RT-PCR was carried out. Only the blood sample from one of these sheep was positive and the sequence of the fragment proved that it belonged to BTV

serotype 1. This demonstrates that blood is a good sample for the detection of serotype 1. Further assays will be developed in order to determinate the efficacy of this RT-PCR.

**Key words:** Bluetongue, RT-PCR, serotype.

### **Introducción**

La lengua azul (LA) es una enfermedad causada por un virus ARN bicatenario sin envuelta y de simetría icosaédrica perteneciente el género *Orbivirus*. Este virus afecta a óvidos, bóvidos y otros rumiantes como pueden ser los cérvidos y se transmite por insectos del género *Culicoides*. Algunos de los síntomas que produce son edema, coronitis que da lugar a cojera, úlceras en mucosas y encías y cianosis de la lengua, lo que le da el nombre debido a la tonalidad azulada de la misma. Es una enfermedad que da lugar a grandes pérdidas económicas.

Se conocen 24 serotipos de LA, cuya distribución ha aumentado en los último diez años hasta superar el paralelo 40° N (límite norte de la distribución de la enfermedad hasta 2006), llegando en la actualidad a afectar países europeos que se encuentran a latitud 60° N. Los serotipos 1, 2, 4 y 8 han producido pérdidas económicas en España desde el año 2000. En el resto de Europa circulan, además, los serotipos 8, 9 y 16.

Las secuencias génicas que codifican proteínas víricas, tanto estructurales como no estructurales, se utilizan como diana para detectar la presencia del virus. Entre ellas, cabe destacar las proteínas VP2 y NS1. La primera forma parte de la capa externa del virus y presenta gran variabilidad entre los serotipos, por lo que se usa para una detección seroespecífica. La segunda es no estructural y su secuencia genética está muy conservada en distintos serotipos, por lo que sirve para la detección genérica del virus.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la distribución del virus en distintos tejidos de ovejas infectadas de manera natural, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa (RT-PCR) para poder detectar el virus.

### **Material y métodos**

- **Animales:** Se obtuvieron muestras de tejidos provenientes de dos ovejas con síntomas evidentes de LA (cojera, edema facial, descarga nasal y ulceración en las encías). Tras la eutanasia con sobredosis de pentobarbital sódico se obtuvieron muestras de bazo, arteria pulmonar, sangre y suero. Por cada oveja, se han analizado cinco muestras distintas procedentes de cada tipo de tejido.

• **Extracción de ARN:** se parte de 100µl de sangre, suero y del homogeneizado de los tejidos. Se usó el reactivo Trizol (Invitrogen). El protocolo realizado se describe

en (Chomczynski et al., 1987). Brevemente, el proceso consta de separar todos los componentes lipídicos de cada muestra, de la fase soluble en agua, donde se encuentra el ARN. Después se realiza una precipitación del ARN con etanol y la muestra se resuspende en agua libre de RNAsas.

- **RT-PCR:** Se amplificó el fragmento de ARN que codifica las proteínas VP2 y NS1 usando cebadores genéricos del virus de LA (*Figura 1*) y específicos del serotipo 1 (*Figura 2*)

La reacción de RT-PCR consta de 40 ciclos en los que se repiten tres pasos precedidos del paso de retrotranscriptasa, en el que esta enzima realiza copias de ADN a partir de ARN a 48°C. Los tres pasos de la PCR constan de: un paso a 95°C para la desnaturalización de las hebras, un paso a 52°C para la unión de los cebadores y un paso a 72°C para que la polimerasa transcriba dando lugar a más copias. Se obtienen mas de dos billones de copias del fragmento que queremos amplificar.

- **Controles:** Como control positivo se utilizó una muestra de ARN del virus de LA del serotipo 1 obtenida por infección de un cultivo celular de células de riñón de mono verde. Como control negativo se utilizó una muestra de ARN del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) y tres muestras en las que se utilizó agua destilada para realizar el proceso de extracción de ARN.

- **Electroforesis:** gel de agarosa al 2% teñido con colorante SYBR-GREEN, que se une a ácidos nucleicos de cadena doble, para visualizar los productos de la RT-PCR. Se usa un marcador de pesos moleculares como referencia, en el que cada banda se corresponde con cien pares de bases. Esta técnica se basa en la carga parcial negativa de la muestra que le permite el desplazamiento por el gel según su tamaño. En la RT-PCR genérica el fragmento es de 274 pares de bases y en la específica del serotipo 1 es de 765 pares de bases (*Figura 3*).

## Resultados

Tras el análisis de cinco muestras de suero, sangre, bazo y arteria pulmonar procedentes de dos ovejas con síntomas de LA, se obtuvieron los siguientes resultados:

- **Ensayo de RT-PCR genérica de LA:** únicamente las muestras de sangre de una de las ovejas dieron resultado positivo con esta técnica.

- **Ensayo RT-PCR específica:** Los resultados obtenidos son similares a los del ensayo genérico, mostrando bandas positivas correspondientes al serotipo 1 de LA sólo la muestra de sangre procedente de la oveja número 1.

- **Secuenciación:** el fragmento de ADN amplificado por la RT-PCR específica se mandó a analizar al servicio de secuenciación SECUGEN, SL, comprobándose que correspondía con serotipo 1 de LA.

### **Conclusiones**

La técnica de RT-PCR es novedosa en cuanto a su aplicación para la detección específica de serotipos de LA. Los estudios en los que se han desarrollado los cebadores para la detección de los serotipos de LA presentes en Europa se han publicado recientemente (Mertens et al., 2007). En este estudio hemos aplicado la técnica de RT-PCR para la detección del virus en distintas muestras procedentes de ovejas con síntomas de LA. Los resultados obtenidos han permitido detectar el virus de LA únicamente en sangre procedente de una de las ovejas analizadas. Los resultados negativos en la detección del virus en las restantes muestras, a pesar de la evidente sintomatología observada en los individuos, puede deberse a dos razones. Puede suponerse que la RT-PCR no presenta suficiente sensibilidad para la detección del virus en los tejidos analizados o que la infección era muy inicial y todavía no se había acantonado en ellos y había una mayor proporción de partículas virales circulantes en sangre.

La detección del virus solamente en sangre de una de las ovejas parece indicar que el virus permanece unido a eritrocitos durante todo el periodo de viremia, por lo que esta muestra sería la más adecuada para realizar estudios de detección del virus. A pesar de ello, aún es necesario realizar más ensayos con un número mayor de muestras.

### **Agradecimientos**

**Se sugiere que se redacten en frases del tipo “Al Dr (o Drs). D.,...,del .... por ...)**

Dr. José Manuel Sánchez-Vizcaíno <sup>1</sup>

Belén Rodríguez Sánchez <sup>1</sup>

Dr. Pedro Sánchez Cordon <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dpto. Sanidad Animal. Facultad Veterinaria. Universidad Complutense Madrid

<sup>2</sup> Dpto. Anatomía Patológica. Facultad Veterinaria. Universidad Córdoba.

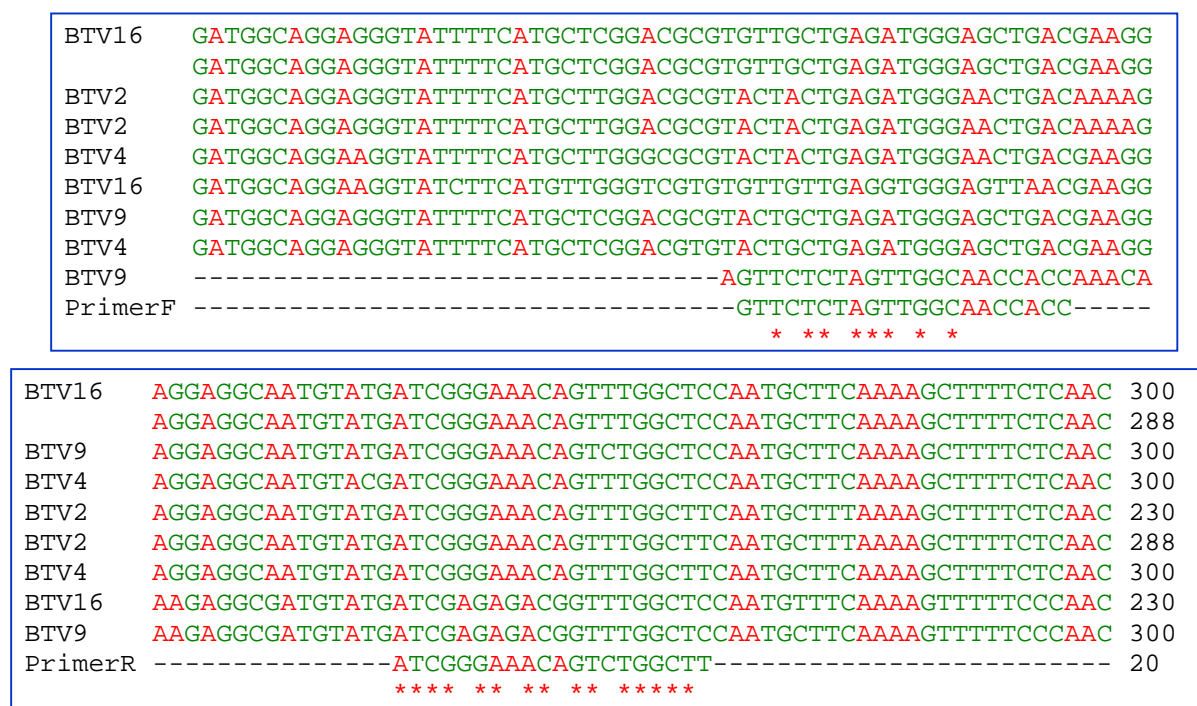
### **Bibliografía**

**Agüero M, Arias M, Romero LJ, Zamora MJ, Sánchez-Vizcaíno JM. 2002.** Molecular differentiation between NS1 gene of a field strain Bluetongue virus serotype 2 (BTV-2) and NS1 gene of an attenuated BTV-2 vaccine. *Vet. Microbiol.*, 86:337-41.

**Chomczynski P. and Sacchi N. 1987.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*, 162:156-9.

**Mertens PP, Maan NS, Prasad G, Samuel AR, Shaw AE, Potgieter AC, Anthony SJ, Maan S. 2007.** Design of primers and use of RT-PCR assays for typing European bluetongue virus isolates: differentiation of field and vaccine strains. *J. Gen. Virol.*, 88:2811-23

**Shaw AE, Monaghan P, Alpar HO, Anthony S, Darpel KE, Batten CA, Guercio A, Alimena G, Vitale M, Bankowska K, Carpenter S, Jones H, Oura CA, King DP, Elliott H, Mellor PS, Mertens PP. 2007.** Development and initial evaluation of a real-time RT-PCR assay to detect bluetongue virus genome segment 1. *J. Virol. Methods*, 145:115-26.



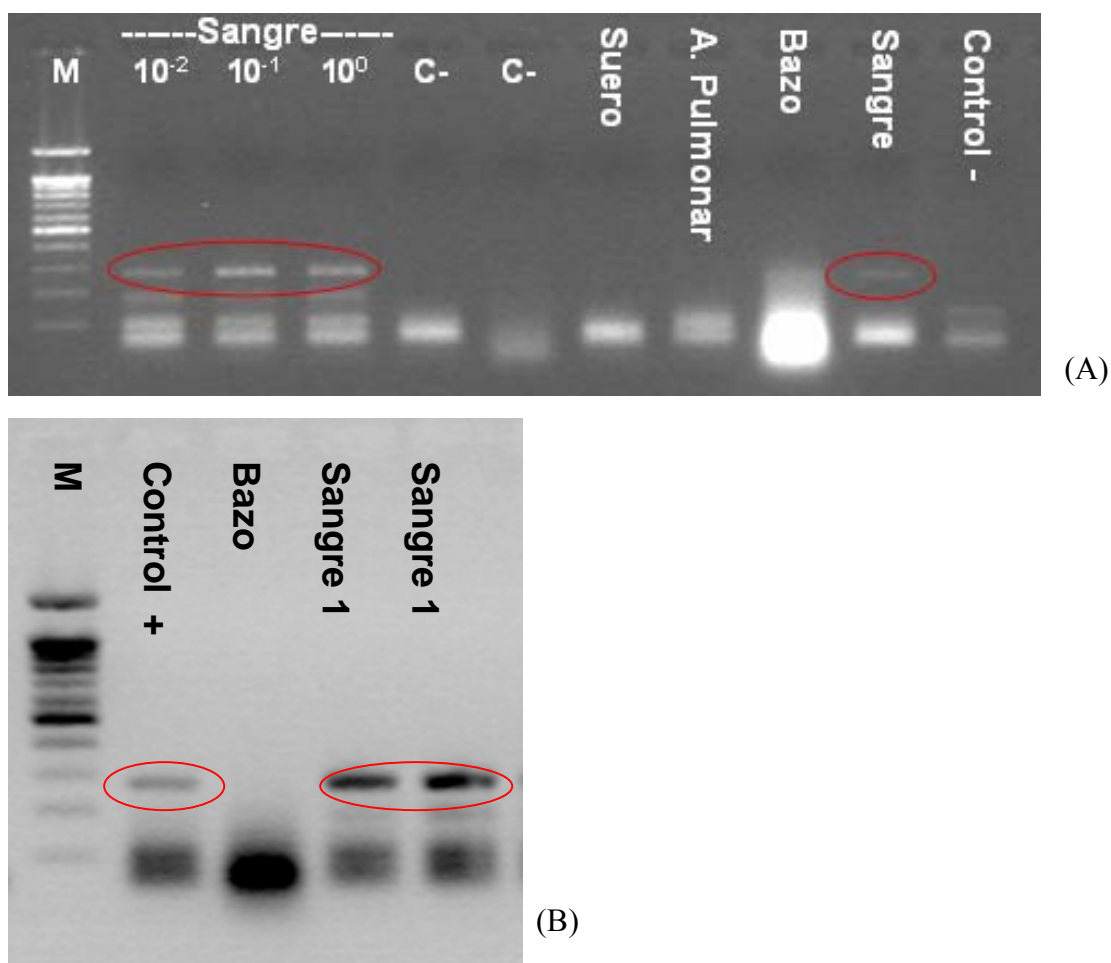
**Figura 1.** Alineamiento de la secuencia codificante de la proteína NS1 de distintos serotipos de LA con la secuencia de los primers genéricos de lengua azul.

BTV1	AGTTCCGACAACATGATCCTGAGCGCCTGAAGATATTTGAGCATAGGAATCAACGTAGAG	1020
PrimerF	-----GRAATCATCGYAGAG	15
	*****	*****

BTV1	CTTTAAGAGGACAGGCGCTTTCGCGGCAACAGGCACAGTCCACTTACGATGAAGAAATAT	1800
PrimerR	-----CAGGCGCTYTCRCGRCARCA-----	19
	*****	

**Figura 2.** Alineamiento de la secuencia de VP2 del serotipo 1 de LA con los primers específicos del serotipo 1 utilizados en este estudio.



**Figura 3.** Geles de agarosa con controles positivos y negativos y marcador de pesos moleculares. **(A)** Resultados obtenidos en el ensayo genérico de LA. Muestras de sangre, normal y diluida; bazo, arteria pulmonar y controles negativos. **(B)** Resultados obtenidos en el ensayo de RT-PCR específico para el serotipo 1 de LA. Muestras de sangre, bazo y control positivo.