

1 **DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE PCR PARA DETECTAR**
2 **VIRUS MAEDI-VISNA (VMV) LIBRE E INTEGRADO EN CÉLULAS**
3 **Y APLICACIÓN AL ESTUDIO DE LA INFECCIÓN CALOSTRAL EN**
4 **CORDEROS**

5
6 Development of a PCR test to detect cell-free and -integrated Maedi-Visna virus (MVV)
7 and it's use to investigate colostral infection in lambs
8

9 **Daltabuit-Test M.¹, Juste R.A., Berriatua, E.*²**

10
11 Sanidad Animal, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER),
12 c/ Berregu 1, 48160 Derio, Vizcaya, España.

13 ¹ Dirección actual: Immune Biology of Retroviral Infection.Vaccine Branch. NIH, NCI,
14 CCR. Building 41, Room D310. 41 Medlars Drive MSC 5065. Bethesda, MD 20892-
15 5065. EEUU

16
17 ***Autor para correspondencia y ²dirección actual: Eduardo Berriatua, Sanidad Animal,**
18 Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100 Campus de Espinardo, Murcia,
19 España. Tel: 00 44 968 363 997, Fax: 968 364 147, Email: berriatu@um.es

20
21 **Título abreviado:** PCR para virus Maedi-Visna libre e integrado
22

1 **RESUMEN**

2 Se desarrolló una técnica de PCR para detectar virus maedi-visna (VMV) libre e
3 integrado en células, se estudio su concordancia con una PCR-LTR y un ELISA de
4 anticuerpos de probada eficacia en muestras de calostro de ovejas infectadas y se
5 emplearon los tres ensayos para investigar la infección calostral por VMV en corderos.
6 Los cebadores se diseñaron en una región conservada en las seis secuencias de VMV
7 disponibles en GenBank y amplifican un producto de 744 pares de bases (pb). Se
8 realizaron 856 ensayos incluidos 283 con la *gag*, e independientemente de la PCR
9 empleada se observó una buena correlación entre la presencia de virus libre e integrado
10 y esto es novedoso y plantea la importancia relativa de ambas formas víricas en la
11 infección por VMV. En cambio, la concordancia entre las PCRs y el ELISA fue solo
12 moderada y se corroboró que a menudo no se detecta VMV en animales seropositivos.
13 Las PCRs detectaron VMV en la mayoría de calostros ingeridos por corderos que
14 posteriormente a los 10 meses de edad fueron seropositivos y además la *gag* y en menor
15 medida la LTR, también en algunos calostros de corderos que fueron seronegativos,
16 probablemente porque tomaron menos cantidad de calostro que los seropositivos.
17 Además de aportar mas evidencia de la asociación positiva entre la infección por VMV
18 y el volumen de calostro con VMV ingerido, este resultado sugiere que la *gag* es más
19 sensible que la LTR en esta matriz

20 **Palabras clave:** PCR, virus maedi-visna, gen *gag*, calostro, transmisión

21
22
23 **ABSTRACT**

24 A PCR test was developed to detect cell-free and cell-integrated maedi-visna virus
25 (MVV), its degree of agreement with another PCR and an antibody ELISA of proven

1 efficacy was analysed in colostrum samples and all three tests were employed to
2 investigate colostral MVV infection in lambs. Primers were designed from *gag* gene
3 sequences homologous in the six MVV sequences presently in GenBank, and amplify a
4 744bp fragment. 856 assays were carried out including 283 with the new *gag*-PCR and
5 a good correlation was observed between the presence of cell-free and -integrated
6 MVV. This is novel and questions the relative role of the two viral forms in MVV
7 infection. Instead, the correlation between PCR and ELISA results was only moderate
8 and provided further evidence that MVV detection may fail in infected animals. The
9 PCRs detected MVV in colostrum ingested by most lambs that later tested seropositive
10 at 10 months-old and additionally, the *gag*-PCR and to a lesser extent the LTR-PCR
11 detected MVV in colostrum taken by lambs seronegative at 10 months-old most likely
12 because they ingested less colostrum. As well as providing further evidence of the
13 positive association between MVV infection and volume of MVV-containing colostrum
14 ingested, this result suggest that the *gag*-PCR developed is more sensitive than the
15 LTR-PCR used in this study.

16 **Key words:** PCR, maedi-visna virus, *gag* gene, colostrum, transmission

17

18

1 INTRODUCCIÓN

2 El virus maedi-visna (VMV) y el virus de la artritis encefalitis caprina son
3 lentivirus de la familia retroviridae que inducen enfermedad pulmonar, mamaria,
4 articular y nerviosa en pequeños rumiantes y que cursa de forma lenta y fatal (Radostits,
5 2000). Hasta la aparición de los primeros síntomas clínicos pueden pasar varios años y
6 tradicionalmente durante este periodo era frecuente no detectar anticuerpos o virus en
7 sangre y esto se consideraba asociado a la tendencia del virus a localizarse integrado en
8 macrófagos en órganos diana y evadir la respuesta inmunológica (Rimstad y col., 1993).

9 La detección de la seroconversión y del virus ha mejorado con la aparición de nuevos
10 ensayos de mayor validez que los que se empleaban antes incluidos los ELISAs
11 recombinantes (Saman et al, 1999) y las técnicas de PCR (PCRs). Las PCRs existentes
12 detectan mayoritariamente virus integrado en macrófagos y tienden a ser muy
13 específicas, pero carecen de elevada sensibilidad debido a la gran variabilidad genética
14 de los lentivirus. Una de las PCRs más eficaces es la basada en la amplificación de las
15 secuencias de DNA “long terminal repeats” (LTR) del VMV, aunque su sensibilidad en
16 infecciones subclínicas es <80% (Extramiana y col., 2002; Daltabuit, 2005). Estas
17 técnicas se emplearon en un estudio reciente sobre la transmisión de VMV en calostro y
18 se observó que la eficiencia de transmisión varió según el modo de ingestión, lactancia
19 directa de la madre o indirectamente mediante biberón, y entre estos últimos según la
20 cantidad ingerida, de modo que en los que tomaron el calostro con biberón el porcentaje
21 de seroconversión osciló entre 29-61% mientras que en los que lo tomaron directamente
22 de su madre fue 16% (Álvarez y cols., 2005 a y b). Entre otras razones, es posible que la
23 ausencia de seroconversión en gran parte de los corderos que tomaron calostro de oveja
24 seropositiva se debiese a que éstas no estuviesen realmente infectadas y a que exista una
25 pobre correlación entre el estado serológico materno y la presencia de virus en calostro.

1 Más aún, la PCR empleada no detecta virus libre y esto podría limitar en gran medida su
2 sensibilidad diagnóstica.

3 Los resultados anteriores indican la necesidad de comprobar la presencia o ausencia
4 de VMV en el calostro de las ovejas seropositivas del este estudio para una mejor
5 comprensión de la transmisión calostral del VMV y de la validez diagnóstica de los
6 ensayos directos e indirectos del VMV. En el presente trabajo se elaboró un ensayo
7 PCR para detectar VMV RNA libre e integrado, se analizó su sensibilidad diagnóstica
8 con respecto al ELISA y la LTR-PCR en las muestras del estudio de la transmisión
9 calostral del VMV y las implicaciones en la transmisión del VMV por calostro.

10

11

12 **MATERIAL Y MÉTODOS**

13

14 **Abordaje experimental y población de estudio**

15 En este trabajo se llevaron a cabo los siguientes objetivos cronológicamente: (i) se
16 diseñó una técnica de PCR para detectar VMV libre (RNA) e integrado (DNA), (ii) se
17 empleó la PCR desarrollada para analizar la presencia de VMV en calostro de 150
18 ovejas y se compararon los resultados con los obtenidos antes con la PCR LTR y el
19 ELISA en las mismas muestras y (iii) se analizó el porcentaje de seropositividad a la
20 técnica ELISA en un grupo de 114 corderos a los 300 días de edad en función del
21 resultado de PCR del calostro ingerido tras el nacimiento. Estos corderos, hijos de
22 madres seropositivas a VMV, pertenecieron a un experimento de 3 años de duración
23 para estudiar la transmisión lactogena del VMV (Álvarez y cols. 2005 a y b). Al
24 nacimiento, los corderos de este estudio se asignaron a tres grupos experimentales y se
25 les permitió tomar el calostro materno directamente de la madre (grupo PFO) o se les

1 dio el calostro materno con biberón a razón de 190-830 ml (grupo PSOL) y 850-1390
2 ml (PSOH), respectivamente (Álvarez y cols. 2005a). A partir de las primeras 24 horas
3 de vida los corderos se criaron juntos en una nave sin otros ovinos hasta los 300 días de
4 edad y durante este tiempo estuvieron expuestos de modo similar a la infección
5 aerógena de VMV.

6

7 **Obtención y procesado de sangre y leche y ensayos ELISA y LTR-PCR.**

8 Las muestras de sangre se recogieron en tubos de 10ml con anticoagulante EDTA y
9 las de calostro en envases de polipropileno de 50ml. El procesado de las muestras de
10 sangre para obtener plasma, células blancas y la realización de ELISA y la LTR-PCR se
11 llevó a cabo según describen Saman y cols. (1999) y Extramiana y cols. (2002).

12 Respecto al calostro, se partió de un volumen inicial de 35ml y tras añadir 15ml de
13 PBS estéril para reducir su viscosidad, se centrifugó la mezcla a 2000 x g en una
14 centrífuga Megafuge 1,0 (Heraeus) durante 10 minutos a 4°C. A continuación se
15 eliminó la capa superior de grasa con una espátula de madera, se extrajo el sobrenadante
16 que se congeló a -70°C y se lavaron las CS del sedimento tres veces resuspendiendo el
17 sedimento en 30ml de solución salina tamponada (PBS) y centrifugando a 2000 x g
18 durante 10 minutos en cada ocasión. Finalmente se diluyeron las CS en 4ml de PBS y
19 tras dividir la muestra en cuatro volúmenes iguales en tubos de 1,5ml de polipropileno,
20 se centrifugaron los tubos a 14.000 x g en una microcentrífuga (Biofuge Heraeus)
21 durante 1 minuto, se decantó el sobrenadante y se almacenó el sedimento con las CS a -
22 20°C para posteriormente extraer el DNA y realizar las pruebas de LTR-PCR y Gag-
23 PCR.

24

25 **Obtención, tratamiento con DNAsas y cuantificación de RNA de calostro**

1 Se utilizó el Kit Qiagen (*RNeasy Lipid Tissue Mini for total ARN isolation from*
2 *adipose tissue, brain and other fatty animal tissues*) para obtener RNA del sobrenadante
3 de calostro siguiendo el protocolo descrito en el kit. Tras descongelar las muestras de
4 sobrenadante, se separaron 100 μ l y una vez a temperatura ambiente se añadieron 200 μ l
5 de cloroformo y tras homogenizar la muestra de manera vigorosa durante 15 segundos
6 se centrifugó la mezcla a 12,000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente con el
7 fin de recuperar la fase acuosa superior con el RNA. A continuación se añadieron 600 μ l
8 de etanol 70% a la fase acuosa y tras homogeneizar la mezcla con un vórtex durante
9 varios segundos se pasó la mezcla a una columna (mini spin column) que se centrifugó
10 a 8000 x g durante 15 segundos a temperatura ambiente con el fin de separar el
11 componente líquido, del RNA total que queda unido a la membrana de la columna. Para
12 completar los 900 μ l de mezcla fue necesario repetir este paso dos veces. A continuación
13 se lavó la membrana añadiendo 700 μ l de buffer RWI (Qiagen) y centrifugando durante
14 15 segundos a 8000 x g. Después se secó la columna en dos pasos, en el primero se
15 añadieron 500 μ l de buffer RPE (kit Qiagen) y se centrifugó la columna durante 15
16 segundos a 8000 x g y en el segundo paso se añadieron 500 μ l de RPE (Qiagen) y se
17 centrifugó la columna durante 2 minutos a 8000 x g. Finalmente se recuperó el RNA de
18 la membrana añadiendo 50 μ l de agua libre de RNAsas y centrifugando la columna a
19 8000 x g durante 1 minuto y se congeló a -70 °C para su uso posterior.

20 Se utilizó el Kit *RQ1 RNase free DNase* (Promega) para tratar las muestras con
21 DNAsas. En un vial de polipropileno de 1,5ml se mezclaron 8 μ l del RNA diluido en
22 agua del paso anterior con 1,5 μ l de *RQ1 RNase Free DNase 10X reacción buffer*⁺, 3 μ l
23 de *RQ1 RNase Free DNase* (Promega) y 2,5 μ l de agua libre de nucleasas. A
24 continuación se incubó la mezcla a 37°C durante 30 minutos y al término de la

1 incubación se adicionó 1,5 μ l de *RQ1 DNase stop solution* (Promega), aumentando la
2 temperatura a 65°C durante 10 minutos con el fin de frenar la reacción. Finalmente se
3 congeló la muestra –70°C hasta su posterior uso.

4 Se midió la pureza y la concentración del RNA extraído con un espectrofotómetro
5 Nanodrop ND-1000 (NanoDrop technologies). Se tomaron 2 μ l de muestra, calculando
6 la pureza con el ratio de absorbancia 260/280nm considerando como suficientemente
7 puro ratios de ~2,0. La concentración de RNA, se calculó multiplicando la A260 por la
8 constante de análisis que en el caso del RNA es de 40 (Concentración = A260X50)
9 (Sambrook, 1989).

10

11 **Diseño de una PCR para detectar virus libre e integrado.**

12 Se seleccionó la secuencia *gag* del genoma del VMV para diseñar cebadores que
13 permitiesen realizar PCR en virus integrado (DNA) y libre (RNA). Se trabajó sobre la
14 secuencia del VMV, S51392 como patrón y de otras secuencias publicadas en Genbank
15 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>). Se localizó una región de este gen
16 conservada en todas las cepas y los cebadores se diseñaron de modo que el fragmento
17 fuese de menos de menos de 25 bases, con un porcentaje de guaninas (G) y citosinas (C)
18 entre el 40 y 60%, evitando la formación de dímeros, con una temperatura de
19 desnaturalización (T^o_m) similar entre los cebadores y con un producto de amplificación
20 de 500-1000 pares de bases (pb). Las condiciones de las distintas variables de PCR se
21 describen en la tabla 2.

22

23 **Análisis Estadístico**

24 Se empleo la técnica de chi-cuadrado de Yates para comparar proporciones en
25 EpiInfo 6.0 (CDC, Atlanta) y se calculó el coeficiente *kappa* para medir el grado de

1 concordancia entre dos técnicas según seg\xfcreo Dohoo y cols. (2003). Se tomó un nivel de
2 significación del 5% (p<0,05).

3

4

5 **RESULTADOS**

6

7 **Cebadores y condiciones de reacción de la PCR *gag***

8 Las secuencias elegidas para diseñar los cebadores son idénticas en las 6 secuencias
9 del VMV del GenBank y se muestran en la tabla 1. Los cebadores diseñados amplifican
10 un fragmento de 744 bases de RNA (*gag*-RT) o DNA (*gag*) y la concentración de
11 reactivos, el número de ciclos y las temperaturas de desnaturación, hibridación y
12 elongación de las *gag* y la LTR empleadas en el estudio se describen en la tabla 2.

13

14 **Porcentaje de ensayos PCR y ELISA positivos**

15 Durante los 3 años del estudio experimental de la transmisión lactógena de VMV se
16 realizaron 856 ensayos en muestras de sangre y calostro de ovejas tomadas tras el
17 nacimiento de los corderos experimentales y 283 muestras de calostro se procesaron con
18 la *gag*. El porcentaje de ovejas ELISA-seropositivas durante el primer y segundo año
19 fue 82% y 78%, respectivamente, mientras que el porcentaje de LTR positivas en sangre
20 fue inferior sobretodo el segundo año (Cuadro 3). Respecto a los ensayos en calostro, el
21 porcentaje de muestras ELISA-positivas fue muy similar al obtenido en sangre. Por otro
22 lado el porcentaje de resultados PCR-positivos en calostro fue inferior al detectado
23 mediante ELISA y osciló entre 49-54% y no se observaron diferencias según el tipo de
24 PCR (p>0,05) (Cuadro 3). Entre las muestras de calostro ELISA-positivas procesadas
25 por PCR, el 78% (78/100) fue positiva a una o más PCRs y el porcentaje de positivas

1 según la técnica de PCR fue 56% (66/114) para la LTR, 62% (67/109) para la *gag*-RT y
2 65% (73/112) para la *gag* ($p>0,05$) (resultados no mostrados).

3

4 **Comparación de técnicas de diagnóstico en calostro y sangre**

5 La tabla 4 presenta las comparaciones de ELISA y PCR para el diagnóstico del
6 VMV en sangre y calostro realizadas. El grado de concordancia del ELISA en sangre y
7 calostro fue muy bueno y el de las distintas PCRs en calostro fue bueno o moderado.
8 Sin embargo, el grado de concordancia entre ELISAs y PCRs en el mismo o distinto
9 tipo de muestras o el de las distintas PCRs en distintos tipos de muestra fue regular. La
10 concordancia de la LTR en sangre y calostro fue moderada.

11

12 **Relación entre el estado de PCR del calostro y la seroprevalencia en corderos a los
13 300 días de edad.**

14 Como se mencionó en la introducción, el porcentaje de corderos ELISA-positivos a
15 los 300 días de edad varió según el estado VMV-PCR del calostro y el volumen de
16 calostro ingerido mediante biberón y fue máxima para los que tomaron un volumen alto
17 en biberón (PSOH), mínima para los que lo tomaron directamente de la madre (PFO) e
18 intermedia para los que tomaron volúmenes bajos y medios de calostro en biberón
19 (PSOL). En la tabla 5 se presenta el porcentaje de corderos seropositivos a los 300 días
20 de edad en función del resultado de PCR del calostro que tomaron, según el grupo
21 experimental. Puede observarse que entre los corderos que tomaron volúmenes altos de
22 calostro (PSOH), la seropositividad a los 300 días fue independiente del resultado frente
23 a la técnica de PCR del calostro que ingirieron (Cuadro 5). Por otro lado, en los que
24 tomaron el calostro directamente de la madre (PFO), el porcentaje de corderos
25 seropositivos fue menor entre los que tomaron calostro LTR-negativo que entre los que

1 tomaron calostro LTR-positivo, pero esta diferencia no se observa para las otras PCRs
2 (Cuadro 5). Finalmente, en los corderos que tomaron una cantidad baja o media de
3 calostro con biberón, el porcentaje de seropositivos fue mayor en los que tomaron
4 calostro positivo a cualquiera de las PCRs que en los que tomaron calostro PCR
5 negativo (Cuadro 5).

6

7

8 **DISCUSIÓN**

9

10 Los resultados de este trabajo indican que es posible elaborar un ensayo de PCR en
11 una región conservada de VMV de distintos orígenes geográficos y detectar VMV libre
12 en calostro y esto facilitará el estudio de la infección por VMV. La buena concordancia
13 en los resultados obtenidos mediante *gag*-RT y *gag* y LTR indica que el calostro
14 contiene simultáneamente virus libre y e integrado en células. Este aspecto cuestiona el
15 mecanismo de infección del VMV y en particular la importancia relativa del virus libre
16 e integrado en el contagio. Por otro lado, destaca el bajo grado de concordancia entre las
17 PCRs y entre el ELISA y las PCRs en sangre y calostro. Es mas fácil de explicar la
18 discrepancia entre el ELISA y las PCRs pues los ensayos miden parámetros distintos,
19 anticuerpos y virus, respectivamente, aunque no sean independientes entre si. Sin
20 embargo, no está claro a qué puede ser debida la diferencia entre los resultados de PCR
21 en sangre y calostro y podría estar relacionado a distintos factores incluidos la
22 capacidad del virus por infectar la glándula mamaria (Lerondelle & Ouzrout, 1990).

23 Se observó una buena correlación positiva entre el resultado de PCR del calostro y el
24 porcentaje de corderos ELISA-positivos a los 300 días de edad que habían tomado
25 volúmenes bajos y medios de calostro en biberón (PSOL). Sin embargo, no se observó

1 esta correlación en otros corderos, excepto cuando se empleo la LTR en calostro de
2 corderos que tomaron el calostro directamente de su madre (PFO). El hecho de que el
3 riesgo de seroconversión sea independiente del estado de PCR del calostro sugiere que
4 la mayoría del calostro ingerido por los corderos del grupo PSOH contenía virus aunque
5 en algunos casos en cantidad inferior a la detectable por PCR pero suficiente para
6 producir infección cuando se toma una cantidad elevada de calostro. Por extensión es
7 muy probable que los calostros PCR-negativos de los otros grupos (PFO y PSOL)
8 también tuviesen virus aunque al consumirse en baja cantidad no se alcanzó el umbral
9 de infección. De hecho, los niveles de seropositividad en los corderos de los grupos
10 PFO y PSOL que tomaron calostro LTR-negativo oscilaron entre 4% y 10%, similares
11 al de los corderos que no tomaron calostro libre de VMV (Álvarez y cols., 2005a y b).
12 Diversos autores han demostrado la presencia de VMV en calostro y leche de ovejas
13 infectadas (Houwers, 1990) pero se desconoce la dosis mínima de virus en calostro
14 capaz de producir infección. Cabe esperar que esta dosis no sea fija y dependa de otros
15 factores como la cepa de virus y características propias de los animales. El empleo de
16 nuevas técnicas capaces de cuantificar la cantidad de virus presente en calostro, como la
17 PCR a tiempo real, permitirán un análisis más preciso de la relación entre la ingestión
18 de calostro de madres infectadas y el riesgo de infección en los corderos. En cualquier
19 caso, y desde el punto de vista diagnóstico estos resultados podrían sugerir que la *gag*
20 diseñada es ligeramente más sensible que la LTR. De hecho aunque no se detectaron
21 diferencias significativas, el porcentaje de muestras positivas a la *gag* fue
22 numéricamente superior al de la LTR.

23 Los resultados del presente trabajo confirman el hallazgo realizado por Álvarez y
24 cols. (2005a y b) según el cual tomar el calostro mediante biberón es un factor de riesgo
25 significativo en la transmisión del VMV vía lactógena y que se reduce

1 considerablemente cuando los corderos lo toman directamente de sus madres. No se
2 conocen las razones de ello y como ya se ha expuesto los citados autores sugirieron la
3 posibilidad de que la administración de calostro mediante biberón podría facilitar la
4 aspiración del calostro y la infección, que el amamantado vaya asociado a un
5 incremento de la producción de saliva con propiedades antivirales o que el ordeño y
6 administración del calostro en biberón destruya componentes antivirales del calostro.

7 Desde el punto de vista del control este trabajo demuestra además, la utilidad de
8 realizar ensayos de PCR en calostro para reducir el riesgo de infección en corderos. Esto
9 sería especialmente útil de cara a seleccionar calostro para almacenar y usar con
10 posterioridad. Es posible sin embargo, que el realizar PCRs para seleccionar calostros
11 libres de virus sea una opción menos económica que las alternativas de someter el
12 calostro a un tratamiento térmico que inactive el VMV o emplear calostro de vaca.

13

14

15 **AGRADECIMIENTOS**

16

17 Este trabajo ha sido posible en parte gracias a un experimento de transmisión del
18 VMV realizado en la Granja Modelo de Arkaute en el que participaron estudiantes y
19 técnicos de NEIKER y a la que estamos muy agradecidos. Durante la realización de este
20 trabajo, Mara Daltabuit disfrutó de una beca de la Fundación Cándido Iturriaga y María
21 Dañobeitia.

1 **BIBLIOGRAFÍA**

2

3 ÁLVAREZ V., ARRANZ J., DALTABUIT-TEST M., LEGINAGOIKOA I., JUSTE
4 R.A., AMORENA B., DE ANDRÉS D., LUJÁN LL., BADIOLA J. J.,
5 BERRIATUA E. 2005A. Relative contribution of colostrum from Maedi-Visna
6 virus (MVV) infected ewes to MVV-seroprevalence in lambs, Res. Vet. Sci. 78:
7 237-243.

8

9 ÁLVAREZ V., DALTABUIT-TEST M., ARRANZ J. , LEGINAGOIKOA I., JUSTE
10 R. A., AMORENA B., DE ANDRÉS D., LUJÁN LL., BADIOLA J. J.,
11 BERRIATUA E. 2005B. PCR detection of colostrum-associated Maedi-Visna virus
12 (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs, Res. Vet.
13 Sci. 80: 226-234.

14

15 DALTABUIT-TEST, M. 2005. Desarrollo y aplicación de técnicas de diagnóstico
16 serológico y molecular para el estudio de la transmisión calostral y horizontal del
17 virus maedi-visna (VMV) en ovino. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.

18

19 DOHOO, I., MARTIN, W. & STRYHN, H. 2003. Measures of association. Veterinary
20 Epidemiologic Research. AVC Inc., Charlottetown, Canada, 121-138

21

22 EXTRAMIANA, A. B., GONZÁLEZ, L., CORTABARRIA, N., GARCÍA, M., &
23 JUSTE, R. A. 2002. Evaluation of a PCR technique for the detection of Maedi-
24 Visna proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep.
25 Small Rum. Res. 44: 109-117.

- 1
- 2 HOUWERS D.J. 1990. Economic importance, epidemiology and control. In: Petursson
3 G., Hoff-Jorgensen R.,(Eds.), Maedi-Visna and related diseases. Kluwer Academic
4 Press, Massachussets: 83-117.
- 5
- 6 LERONDELLE, C. & OUZROUT, R. 1990. Expression of maedi-visna virus in
7 mammary secretions of a seropositive ewe. Develop. Biol. Stand. 72: 223-227.
- 8
- 9 RADOSTITS, O. M., GAY, C. C., BLOOD, D. C., HINCHCLIFF, K. W. 2000. Ovine
10 progressive pneumonia (maedi, maedi-visna). Veterinary Medicine 9th edition, W.
11 B. Saunders Company Ltd, London, United Kingdom: 1186-1189.
- 12
- 13 RIMSTAD, E., EAST, N. E., TORTEN, M., HIGGINS, J., DEROCK, E., PEDERSEN,
14 N. C. 1993. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-
15 encephalitis virus infection in goats. Am. J. Vet. Res. 54: 1858-1862.
- 16
- 17 SAMAN E., VAN EYNDE G., LUJÁN L., EXTRAMIANA A.B., HARKISS G.,
18 TOLARI F., GONZÁLEZ L., AMORENA B., BADIOLA J.J. 1999. A new
19 sensitive serological assay for detection of lentivirus infections in small ruminants,
20 Clin. Diag. Lab. Immunol. 6: 734-740.
- 21
- 22 SANBROOK, J. FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory
23 manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Cork, EEUU.

- 1 Tabla 1. Secuencia y temperatura de desnaturación (T^om) de los cebadores *gag*
2 desarrollados y empleados

Posición	Secuencia	Tm
Forward	GGGACGCCTGAAGTAAGGT A	55,6°C
Reverse	TCAAAATCCTCGGACACAAG	54,8°C

3

1 Tabla 2. **Reactivos utilizados en la técnica de PCR y volumen, número de ciclos y**
 2 **temperaturas de reacción.**

Protocolo	Reactivos	Concentración	Volumen	Ciclos	Temperatura
<i>gag</i>	buffer	1x	2,50 µl	1	95°C/5'
	DNTPs	200µM	2,50 µl	50	94°C/45''
	Mg ₂ Cl	2,5mM	1,25 µl		60°C/30''
	Cebador 1	0,5µM	1,25 µl		72°C/1'30''
	Cebador 2	0,5µM	1,25 µl	1	72°C/10'
	Taq Polimerasa	3U	0,60µl		
	DNA	500ng	5,0 µl		
	Agua		10,65 µl		
	Volume Total		25 µl		
<i>gag-RT</i>	buffer (Mg ₂ Cl)	5X	10 µl	1	50°C/30'
	DNTPs	400 µM	2 µl µl	1	95°C/15'
	Cebador <i>gag1</i>	0,3 µM	1,5 µl	50	94°C/45''
	Cebador <i>gag2</i>	0,3 µM	1,5µl		60°C/30''
	Enzyme mix	(Qiagen)	2 µl		72°C/1'30''
	RNA	120ug	7 µl	1	72°C/10'
	Agua sin RNAsas		26 µl		
	Volumen Total		50 µl		

1 Tabla 3. Porcentaje de ovejas PCR-positivas a VMV en sangre y calostro al parto
 2 en los 3 años del estudio.

Año	Sangre				Calostro								Total tests	
	ELISA		LTR		ELISA		LTR		<i>gag</i>		<i>gag-RT</i>			
	No.	% +	No.	% +	No.	%	No.	% +	No.	%	No.	% +		
A	61	82	64	73	64	84	64	61	62	58	54	52	369	
B	67	78	67	33	67	78	62	39	62	53	67	55	392	
C	NH*	NH	19	20	19	68	19	42	19	42	19	32	95	
Tot.	128	81	150	50	150	79	145	49	143	54	140	51	856	

3 * no hecho

4

- 1 Tabla 4. Comparación de los resultados frente a las técnicas ELISA y PCRs para el
 2 diagnóstico de VMV en sangre (S) y calostro (C) de oveja y en el parto.

Ensayo	Muestra	<i>kappa</i>	% y grado de concordancia
ELISA y LTR	S	0.25	63 Regular (0,21-0,40)
ELISA y LTR	C	0.28	63 Regular
ELISA y <i>gag</i>	C	0.40	70 Regular
<i>gag</i> y LTR	C	0.63	82 Bueno (0,61-0,80)
<i>gag</i> y <i>gag</i> -RT	C	0.58	Moderado (0,41-0,60)
<i>gag</i> -RT y LTR	C	0.63	Bueno
ELISA y ELISA	S y C	0.95	Muy bueno (>0,81)
LTR y ELISA	S y C	0.22	61 Regular
LTR y LTR	S y C	0.42	Moderado
LTR y <i>gag</i>	S y C	0.34	67 Regular
LTR y <i>gag</i> -RT	S y C	0.35	67 Regular

3

- 1 Tabla 5. Porcentaje de corderos ELISA-positivos a los 300 días de edad según el
 2 grupo experimental y el estado de PCR en sangre y calostro de la madre

Grupo Experimental	Madre			Corderos				
	Muestra	PCR y resultado		Nº	% ELISA+			
PFO	Calostro	gag-RT	Neg.	25	16	0,95		
			Pos.	26	15			
PSOH			Neg.	9	67	0,60		
			Pos.	13	77			
PSOL			Neg.	10	10	0,014		
			Pos.	15	60			
PFO		gag	Neg.	21	14	0,71		
			Pos.	33	18			
PSOH			Neg.	6	67	0,80		
			Pos.	18	72			
PSOL			Neg.	7	14	0,11		
			Pos.	18	50			
PFO		LTR	Neg.	24	4	0,03		
			Pos.	27	26			
PSOH			Neg.	6	67	1		
			Pos.	18	67			
PSOL			Neg.	10	10	0,01		
			Pos.	13	61			
PFO		LTR, gag, gag-RT	Neg.	21	10	0,27		

			Pos.	33	21	
PSOH			Neg.	8	75	0,74
			Pos.	19	68	
PSOL			Neg.	10	10	0,02
			Pos.	16	56	

1