

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

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

**Daltabuit-Test M.<sup>1</sup>, Juste R.A., Berriatua, E.\*<sup>2</sup>**

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

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

**\*Autor para correspondencia** y <sup>2</sup>dirección actual: Eduardo Berriatua, Sanidad Animal,  
Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100 Campus de Espinardo, Murcia,  
España. Tel: 00 44 968 363 997, Fax: 968 364 147, Email: [berriatu@um.es](mailto:berriatu@um.es)

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

## RESUMEN

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

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

## ABSTRACT

A PCR test was developed to detect cell-free and cell-integrated maedi-visna virus (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

## 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.

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

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

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Abordaje experimental y población de estudio**

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

### 7 **Obtención y procesamiento 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 procesamiento 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.

### 25 **Obtención, tratamiento con DNAasas y cuantificación de RNA de calostro**

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

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

---

1 incubación se adicionó 1,5µl 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 2µl 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).

#### 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 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<sup>o</sup>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.

#### 23 **Análisis Estadístico**

24 Se empleó 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

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

## RESULTADOS

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

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

### Porcentaje de ensayos PCR y ELISA positivos

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

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

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

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

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

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

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

Los resultados del presente trabajo confirman el hallazgo realizado por Álvarez y cols. (2005a y b) según el cual tomar el calostro mediante biberón es un factor de riesgo 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.

## 15 **AGRADECIMIENTOS**

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 Daltaubuit disfrutó de una beca de la Fundación Cándido Iturriaga y María  
21 Dañobeitia.

## BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

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

EXTRAMIANA, A. B., GONZÁLEZ, L., CORTABARRIA, N., GARCÍA, M., & JUSTE, R. A. 2002. Evaluation of a PCR technique for the detection of Maedi-Visna proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep. 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. & OUZRUT, 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 9<sup>th</sup> 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 desnaturalización (T<sup>o</sup>m) de los cebadores *gag***
- 2    **desarrollados y empleados**

Posición	Secuencia	Tm
Forward	GGGACGCCTGAAGTAAGGTA	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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> Cl)	5X	10 µl	1	50°C/30'
	DNTPs	400 µM	2 µl µl	1	95°C/15'
	Cebador <i>gag</i> 1	0,3 µM	1,5 µl	50	94°C/45''
	Cebador <i>gag</i> 2	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 RNAasas		26 µl		
	Volumen Total		50 µl		

3

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		gag		gag-RT		
	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	79	Moderado (0,41-0,60)
<i>gag</i> -RT y LTR	C	0.63	81	Bueno
ELISA y ELISA	S y C	0.95	98	Muy bueno (>0,81)
LTR y ELISA	S y C	0.22	61	Regular
LTR y LTR	S y C	0.42	71	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		P	
	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