

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

Análisis epidemiológico de las infecciones por lentivirus de pequeños rumiantes (SRLVs) y su contribución al estudio de la patogenia por estos virus

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Nuria Barquero Beña

Directoras

Esperanza Gómez-Lucía y Duato
Ana Doménech Gómez

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL**



*Análisis epidemiológico de las infecciones por
lentivirus de pequeños rumiantes (SRLVs) y
su contribución al estudio de la patogenia
por estos virus*

TESIS DOCTORAL

Nuria Barquero Beña

Madrid 2012



**ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES
POR LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES
(SRLVs) Y SU CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LA
PATOGENIA POR ESTOS VIRUS**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Veterinaria por

Nuria Barquero Beña

Madrid 2012

Directores de Tesis

Dra. ESPERANZA GÓMEZ – LUCÍA Y DUATO

Dra. ANA DOMÉNECH GÓMEZ

Las Dras. Esperanza Gómez-Lucía y Duato, Catedrática de Universidad, y Ana Doménech Gómez, Profesora Titular de Universidad, del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral que presenta la Licenciada NURIA BARQUERO BEÑA con el título: “ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES POR LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES (SRLVs) Y SU CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LA PATOGENIA POR ESTOS VIRUS” ha sido realizada bajo nuestra dirección, y reúne todos los requisitos exigidos para su presentación para obtener el grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, siempre que así lo considere el tribunal correspondiente.

Madrid, octubre de 2012

Fdo. Esperanza Gómez-Lucía y Duato

Fdo. Ana Doménech Gómez

El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Laboratorio del Grupo de Investigación-UCM “Retrovirus Animales” del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria. Ha sido financiado a través de los proyectos AGL2008-04240/GAN del Plan Nacional de I+D (Ministerio de Ciencia y Tecnología) y por los proyectos UCM 920620 GR35/10-A. 2011 y UCM 920620 GR58/08. 2009 (Grupo de investigación-UCM de Retrovirus Animales”, Programa de creación y consolidación de Grupos de Investigación BSCH-UCM).

*A mis hijos Carlos, David y Pablo
A Ernesto*

Agradecimientos:

Como la mayoría de los científicos siempre soñé con realizar mi tesis doctoral y comenzar una carrera profesional en el apasionante mundo de la ciencia. Cuando me llegó la oportunidad sabía lo complicado que iba a resultar pero no lo dudé. Por eso y por todo el apoyo y cariño recibido durante estos años quiero agradecerle a las Dras. Esperanza Gómez-Lucía y Ana Doménech Gómez el haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis, me han guiado, animado y no me han dejado caer cuando he flaqueado.

Ha pasado ya mucho tiempo, pero todavía recuerdo todos los momentos especiales que viví en el departamento y la gente tan maravillosa que conocí allí, de hecho a día de hoy todavía mantengo el contacto con la mayoría y en el mundo de la ciencia que es tan competitivo, esto es complicado. Quiero agradecer su camaradería y apoyo a todo el equipo de “Retrovirus” y especialmente a Álvaro y a Cristina.

Igualmente, me gustaría agradecer a todo el equipo técnico de “mamitis”. Y a los Doctores Las Heras y Fernández-Garayzábal por proporcionarme las muestras y todos los datos de bacteriología, CMT, y de las explotaciones ganaderas.

También quiero aprovechar este apartado para agradecerles a la Dra Kristien Verheyen y Dr Richard Newton todo lo que aprendí sobre epidemiología en los años que estuve trabajando con ellos, conocimientos que he podido aplicar para la realización de esta tesis.

Gracias también a mi familia y amigos, especialmente a mi hermano Fernando, y a mis amigas Marta e Isabel, por hacerme creer que puedo con todo.

Y finalmente, y sobre todo, quiero agradecerles “mis hombres” que han permitido que hoy esté defendiendo esta tesis, mi marido, Ernesto, que me has apoyado siempre. Me animaste a entrar en el departamento me has seguido por medio mundo y me has animado a terminar la tesis. Y a mis hijos Carlos, David y Pablo, ya te puedo contestar Carlos, ¡termino hoy! Sois lo más importante de mi vida y la razón que me hace esforzarme por encima de lo humanamente posible. Me habéis ayudado, habéis soportado largos sábados y domingos sin jugar con mamá, o los malos humos por la falta de sueño y de tiempo. Quiero disfrutar este momento con vosotros porque lo habéis hecho posible y hacéis que todo el esfuerzo merezca la pena.

Índice

Listado de figuras	vii
Listado de tablas	vii
Listado de abreviaturas	ix
Resumen	xi
Summary	xv

I. Introducción general	1
I.1. Historia	3
I.2. Epidemiología	4
I.2.1. Prevalencia	4
I.2.2. Transmisión	5
I.2.3. Rango de hospedadores	6
I.2.4. Factores predisponentes	6
I.3. Etiología	7
I.3.1. La partícula vírica	8
I.3.2. Genoma y productos génicos	9
I.3.3. Replicación	11
I.4. Patogenia y tropismo celular	12
I.5. Respuesta inmunológica	14
I.5.1. Respuesta inmunológica humoral	15
I.5.2. Respuesta inmunológica celular	15
I.6. Cuadro clínico	16
I.6.1. Cuadro respiratorio	16
I.6.2. Cuadro mamario	17
I.6.3. Cuadro articular	17
I.6.4. Cuadro nervioso	18
I.7. Diagnóstico	19
I.7.1. Diagnóstico clínico-epidemiológico	19
I.7.2. Diagnóstico diferencial	19
I.7.3. Diagnóstico anatomopatológico	20
I.7.4. Diagnóstico serológico	20
I.7.5. Diagnóstico etiológico	21

I.8. Importancia Económica	23
I.9. Tratamiento y profilaxis	23
I.9.1. Sistemas de control y/o erradicación	24
II. Objetivos	27
III. Estudio comparativo de métodos diagnósticos para la detección de Lentivirus de Pequeños Rumiantes y el estudio de su prevalencia en ovejas y cabras de la región central de la Península Ibérica	31
III.1. Introducción	33
III.2. Materiales y Métodos	34
III.2.1. Origen y obtención de las muestras	34
III.2.2. Cultivos celulares.....	35
III.2.2.1. Células y virus utilizados.....	35
III.2.2.2. Infección de fibroblastos ovinos con MVV.....	36
III.2.2.3. Obtención de virus a partir de células infectadas.....	37
III.2.3. Pruebas Laboratoriales	37
III.2.3.1. Diagnóstico por PCR.....	37
III.2.3.1.1. Extracción fenólica del ADN de células de la leche y de sangre	37
III.2.3.1.2. Amplificación por PCR- <i>pol</i>	38
III.2.3.1.3. Amplificación de secuencia de <i>LTR</i> (PCR- <i>LTR</i>)	39
III.2.3.2. Diagnóstico por ELISA	40
III.2.4. Estudio Estadístico.....	41
III.3. Resultados.....	42
III.3.1. Confirmación de la especificidad y sensibilidad de la PCR- <i>pol</i> y PCR- <i>LTR</i>	42
III.3.2. Estudio comparativo PCR- <i>pol</i> -ELISA en sangre y leche en ovejas	42
III.3.3. Comparación entre las dos técnicas de PCR y la de ELISA en la leche de ovejas	43
III.3.4. Comparación de dos técnicas de PCR y una de ELISA en leche de cabras	44
III.3.5. Estudio de prevalencia en ovejas y cabras	44
III.4. Discusión	45

IV. Factores asociados a la infección por Lentivirus de Pequeños Rumiantes	51
IV.1. Introducción.....	53
IV.2. Materiales y Métodos.....	53
IV.2.1. Animales	53
IV.2.2. Toma de muestras y diagnóstico de SRLVs.....	54
IV.2.3. Definición de caso	55
IV.2.4. Variables examinadas	55
IV.2.4.1. Variables relacionadas con la glándula mamaria y la presencia de mastitis	56
IV.2.4.2. Variables relacionadas con parámetros productivos y calidad de la leche	57
IV.2.4.3. Variables relacionadas con la explotación ganadera y el sistema de producción.....	58
IV.2.5. Métodos estadísticos	58
IV.3. Resultados	59
IV.3.1. Relación entre la infección por SRLV y las variables relacionadas con la glándula mamaria y la presencia de mastitis	59
IV.3.2. Relación entre la infección por SRLV y la productividad y calidad de la leche	61
IV.3.3. Relación entre la infección por SRLV y variables relacionadas con el tipo de explotación ganadera en ovejas.....	63
IV.3.4. Relación entre la detección vírica en leche por PCR y variables relacionadas con mastitis	64
IV.4. Discusión	66
V. Estudio del seguimiento en el tiempo de la infección por Lentivirus de Pequeños Rumiantes	71
V.1. Introducción	73
V.2. Materiales y Métodos	74
V.2.1. Animales y muestras	74
V.2.2. Diagnóstico de SRLVs.....	75
V.2.3. Análisis Estadístico	75
V.3. Resultados.....	76
V.3.1. Evolución de la infección en ovejas.....	76

V.3.2. Evolución de la infección en cabras.....	79
V.3.3. Relación entre la evolución de la infección en el tiempo y variables relacionadas con la presencia de mastitis	80
V.4. Discusión	82
VI. Conclusiones.....	87
VII. Bibliografía	91

Listado de figuras

I.1: Estructura general de lentivirus.....	8
I.2: Esquema de los genomas provirales de MVV (A) y CAEV (B).	10
I.3: Esquema de Patogenia de SRLVs.	13
III.1: Esquema de la amplificación empleando los oligonucleótidos P1-P2 y LTR2s y LTR2a	40
IV.1. A) Distribución de las ovejas según las razas y B) Distribución de las ovejas y las cabras según el tipo de ordeño.	54
V.1: Evolución en el tiempo de las prevalencias de anticuerpos específicos y ADN proviral en leche de ovejas (A) y cabras (B).	78
V.2: Evolución según el número de lactación del porcentaje de cabras con anticuerpos específicos y con ADN proviral en leche.	82

Listado de tablas

I.1: Transmisión de MVV entre distintos países	4
I.2: Seroprevalencia de MVV en rebaños y en ovejas en España.	5
III.1: Porcentaje de concordancia y coeficientes kappa en el rebaño A (de ovejas) entre ELISA en muestras de sangre y leche, PCR- <i>pol</i> en sangre y leche y ELISA y PCR- <i>LTR</i> en sangre y leche.....	43
III.2: Comparación de las dos técnicas de PCR con ELISA en leche de ovejas.	43
III.3: Comparación de las dos técnicas de PCR con ELISA en leche de cabras..	44
III.4: Seroprevalencia, prevalencia por PCR- <i>pol</i> y prevalencia total en muestras de leche de ovejas.	45
III.5: Seroprevalencia, prevalencia por PCR- <i>pol</i> y prevalencia total en muestras de leche de cabras.	45
IV.1: Resultados de las variables relacionadas con mastitis en ovejas en los grupos SRLV positivo y SRLV negativo.	60

IV.2: Productividad en ovejas y en cabras en los grupos SRLV positivo y SRLV negativo.	61
IV.3: Composición de la leche en ovejas y en cabras en los grupos infectados por SRLVs y en los grupos control.	62
IV.4: Regresión logística univariable con respecto a las variables relacionadas con la explotación ganadera	63
IV.5: Análisis multivariable con y sin explotación como efecto aleatorio.	64
IV.6: Análisis univariable de regresión logística y medias de las variables de mes y número de lactación y de recuento de células somáticas en mama derecha (Drcha) e izquierda (Izda) en ovejas y cabras.	65
IV.7: Análisis univariable entre la detección vírica en leche por PCR y los valores de CMT en ovejas y cabras.	66
V.1: Evolución de la prevalencia mensual de ovejas positivas a SRLV por ELISA y PCR.	76
V.2: Agrupación de las ovejas incluidas en el estudio de seguimiento según su evolución de aparición de anticuerpos detectables por ELISA y de ADN proviral detectable por PCR- <i>pol</i>	77
V.3: Evolución de la prevalencia mensual de cabras positivas a SRLV por ELISA y PCR.	79
V.4: Agrupación de las cabras incluidas en el estudio de seguimiento según su evolución de aparición de anticuerpos detectables por ELISA, y de ADN proviral detectable por PCR- <i>pol</i>	80

Listado de abreviaturas más utilizadas

ADN: ácido desoxiribonucleico

APO: adenomatosis pulmonar ovina

ARN: ácido ribonucleico

AZT: azidothymidine

BIV: virus de la inmunodeficiencia bovina

CA: proteína de la cápside

CAE: artritis encefalitis caprina

CAEV: virus de la artritis encefalitis caprina

CI: Intervalo de confianza

CIA: cloroformo-alcohol isoamílico

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

CMT: Test de Mastitis California

Conc.: concordancia

ddN: 2',3'dideoxynucleótidos

EIAV: virus de la anemia infecciosa equina

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

F1: cruce entre raza Assaf y Manchega

FeLV: virus de la leucemia felina

FIV: virus de la inmunodeficiencia felina

IDGA: inmunodifusión en gel de agar

IFN: interferón

IN: integrasa

κ: Kappa

LTRs: secuencias repetidas terminales largas (*long terminal repeats*)

LV/IFN: interferón lentivirus (LV)/α2 interferón

MA: proteína de la matriz

MV: Maedi-Visna

MVV: virus de Maedi Visna

NC: proteína de la nucleocápside

nt: nucleótidos

OPP: neumonía progresiva ovina

OR: odds ratios

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PR: proteína proteasa

RIPA: radioinmunoprecipitación

ROC: Receiver Operating Characteristic curve

rpm: revoluciones por minuto

RT: transcriptasa inversa

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SFB: suero fetal bovino

SRLVs: Small Ruminant LentiViruses

SU: proteína de superficie

TM: proteína transmembrana

TMB: Tetrametil-benzidina (solución sustrato para ELISA)

Resumen

El diagnóstico de los lentivirus de pequeños rumiantes (SRLVs), el virus de Maedi Visna y el virus de la Artritis y encefalitis caprina, es difícil porque no existe un método diagnóstico estándar. El primer objetivo de esta tesis era determinar si la leche podría ser un sustrato adecuado para el diagnóstico de SRLVs en lugar de la sangre. Para ello se analizaron con el test de ELISA muestras de 50 ovejas tanto de leche como de sus correspondientes muestras de sangre. La concordancia entre los resultados de ELISA en sangre y leche fue de un 90% y el valor kappa fue de un 0,79. Estos resultados apoyan que la leche es un sustituto adecuado de la sangre en el diagnóstico de SRLVs. Además, se realizó un estudio serológico en la región central de España utilizando muestras de leche de 413 animales (250 ovejas y 163 cabras) procedentes de 13 explotaciones. Todas las explotaciones fueron positivas a la infección. Entre los animales, el 60,0% de las ovejas y el 8,0% de las cabras analizadas fueron seropositivas. Este es uno de los primeros estudios que utiliza leche en lugar de sangre para estimar la seroprevalencia de SRLVs así como el estudio de prevalencia más reciente en esta región de España. Además cada muestra fue analizada usando una técnica de PCR (PCR-*pol*, que amplifica un fragmento en el gen *pol*, que está altamente conservado en retrovirus), que aumentó el porcentaje de animales detectados por ELISA. Un total de 72,2% de las ovejas y un 28,8% de las cabras fue positivo a SRLVs por ELISA y/o PCR. Se concluyó que tanto ELISA como PCR se pueden usar para el diagnóstico de SRLV en leche.

Asimismo, se utilizó también una segunda técnica de PCR (PCR-*LTR*, que amplifica un fragmento en el ADN proviral *LTR*) para el diagnóstico de SRLVs. La detección del genoma proviral, a pesar de ser sensible, es difícil debido a la heterogeneidad de los genomas de los SRLVs. Leche de 194 ovejas y 163 cabras procedentes de granjas de la región central de España fueron analizadas usando ambas técnicas de PCR y sus resultados comparados con los resultados obtenidos por ELISA. Cuando se comparó con el ensayo serológico, la concordancia de ambas pruebas de PCR fue muy baja (0,024 y 0,020 en ovejas, y 0,124 y 0,114 en cabras para PCR-*pol* y PCR-*LTR*, respectivamente). A la vista de estos resultados, se podría concluir que la eficacia de la PCR para el diagnóstico de SRLVs es baja y una combinación de PCR y ELISA debiera ser usada para el diagnóstico.

Se llevó a cabo un estudio epidemiológico para identificar factores de riesgo asociados a la infección por SRLVs en la región central de España. Las mismas 194 ovejas y 163 cabras del párrafo anterior fueron analizadas para la detección de SRLVs usando las técnicas de ELISA y PCR-*pol*. El objetivo de este estudio era explorar la relación entre las diferencias en la prevalencia de SRLVs y la localización geográfica de la explotación, las manifestaciones mamarias de la enfermedad y posibles factores relacionados con el rebaño que puedan favorecer la transmisión. Los resultados del análisis multivariable mostraron una asociación entre la infección por SRLVs, la localización geográfica del rebaño y el sistema de explotación.

Además exploramos las diferencias en la productividad entre animales infectados y no infectados. Los parámetros productivos fueron medidos en 62 ovejas y 28 cabras. Todos los parámetros productivos estudiados (como la producción láctea, el número de días en lactación y el número de crías nacidas) parecían estar reducidos en el grupo SRLV-positivo, tanto en ovejas como en cabras. A pesar de que estas diferencias no eran significativas, parece que los animales infectados eran menos productivos que los no infectados. El análisis estadístico comparando animales infectados con no infectados no mostró ninguna relación estadística con respecto a la calidad de la leche.

El último objetivo de esta tesis fue evaluar la presencia en el tiempo de anticuerpos específicos por ELISA y de ADN proviral de SRLV mediante la técnica PCR-*pol*. Se llevó a cabo un estudio de seis meses en muestras de leche de 28 ovejas y 31 cabras criadas de forma intensiva. El porcentaje de animales con anticuerpos anti-SRLV se incrementó durante el periodo de estudio. La seroprevalencia en ovejas era de un 28% al inicio del estudio (Diciembre) y al final del mismo (Junio) se había incrementado hasta un 52,4%. El porcentaje de ovejas PCR positivas se incrementó desde Diciembre (8,0%) hasta Abril (37,5%), pero descendió de forma marcada en Junio (9,5%). En cabras, la seroprevalencia inicial de 5,6% (en Marzo) se incrementó hasta 16% (en Septiembre), pero el porcentaje de cabras PCR-positivas permaneció estable durante el periodo de estudio y osciló entre 35,3% y 55,6%, dependiendo del mes.

De las ovejas positivas, 21,43% fueron PCR-positivas antes de que los anticuerpos pudieran ser detectados, y en muchas de estas ovejas los resultados de PCR pasaron a ser negativos cuando se detectaron los anticuerpos. Varios animales fueron siempre ELISA-positivo o seroconvirtieron durante el estudio pero nunca fueron PCR positivo (14,3% y 7,1%, respectivamente). Todo esto sugiere un control eficiente de la infección mamaria por SRLVs mediante la respuesta del sistema inmune humoral. En cualquier caso, en el 14,28% de las ovejas, los anticuerpos fueron detectados antes de la detección del ADN proviral, implicando una respuesta menos efectiva en estos animales. Por otro lado, la presencia de anticuerpos en la leche de las cabras no pareció ser eficiente en controlar la presencia de SRLVs en leche, a pesar de que el 12,9% de las cabras llegó a ser PCR-negativo durante el periodo de estudio.

Summary

Diagnosis of the small ruminant lentiviruses (SRLV), Maedi-Visna virus and Caprine Arthritis-Encephalitis virus, is difficult because there is not a 'gold standard' diagnostic test. The first aim of the thesis was to determine whether milk could provide an appropriate substrate for diagnosing SRLV infections instead of blood. The diagnosis performance of the ELISA test for detection of antibodies against SRLV in milk and corresponding blood samples was evaluated in 50 sheep. The agreement between ELISA in blood and milk was 90% and the kappa value was 0.79. These results support that milk is a suitable replacement for blood for the diagnosis of SRLV. In addition, a serological survey in the central zone of Spain was performed using milk samples involving 413 animals (250 sheep and 163 goats) from 13 flocks. All flocks were positive to the infection. Among the animals, 60.0% of the sheep and 8.0% of the goats tested were seropositive. This is one of the first studies using milk instead of blood to estimate seroprevalence of SRLV as well as the most recent prevalence study in this region of Spain. Additionally, each sample was tested using a PCR technique (*PCR-pol*, which amplifies a fragment in gene *pol*, which is highly conserved in retroviruses), which increased the percentage of positive animals detected by ELISA. A total of 72.2% of the sheep and a 28.8% of the goats were positive to SRLV by ELISA and/or PCR. It was concluded that milk allows the diagnosis of SRLV by both ELISA and PCR.

In addition, a second PCR technique (*PCR-LTR*, which amplifies a fragment in the proviral *LTR*) was also used for the diagnosis of SRLV. Detection of the proviral genome by PCR, though sensitive, is difficult due to the heterogeneity of the SRLV genomes. Milk from 194 sheep and 163 goats from farms in the Central Spain was analyzed by both PCR techniques and compared to results obtained by ELISA. When compared to the serologic assay, the agreement of both PCR techniques was very low (0.024 and 0.020 in sheep, and 0.124 and 0.114 in goats for *PCR-pol* and *PCR-LTR*, respectively). In view of these results, it may be concluded that the efficacy of PCR for the diagnosis of SRLVs is low and a combination of PCR and ELISA should be used for diagnosis.

An epidemiological study was conducted to identify risk factors related to SRLV infection in the central region of Spain. The same 194 sheep and 163 goats

from 13 flocks of the previous paragraph were tested for SRLV using ELISA and PCR-*pol* tests. The aims of this study were to explore the relationship between differences in prevalence of SRLV and geographical location of the flock, the mammary manifestation of the disease and possible factors related to the flock that could enhance transmission. Multivariable analysis results showed an association between SRLV infection and geographical location of the flock and the rearing system.

In addition we explored the differences on the productivity between infected and non-infected animals. The productivity parameters were measured in 62 sheep and 28 goats. All the productivity parameters studied (such as milk production, number of milking days and lambing rate) appeared to be reduced in the SRLV-positive group in both goats and sheep. Even though these differences were not statistically significant, it seems that animals infected are less productive than non-infected. Statistical analyses comparing infected and non-infected animals showed no statistical relationship between SRLV infection and milk quality.

The last aim of this study was to evaluate the presence of specific antibodies by ELISA and of SRLV proviral DNA by PCR-*pol* throughout time. A six-month study was conducted with the milk of 28 ewes and 31 goats intensively reared. The percentage of animals with antibodies against SRLV increased throughout the study period. Seroprevalence in sheep was 28% at the beginning of the study (December) and by the end (June) it had increased up to 52.4%. The percentage of PCR positive ewes increased steadily from December (8.0%) to April (37.5%), but markedly decreased in June (9.5%). In goats, initial seroprevalence of 5.6% (in March) increased to 16% (in September), but the percentage of PCR-positive goats remained stable throughout the study period and oscillated between 35.3% and 55.6%, depending on the month.

Of the positive sheep, 21.43% were PCR-positive before antibodies could be detected, and in many of these sheep PCR became negative when antibodies were detected. Several animals were either always ELISA-positive or seroconverted during the study but were never PCR-positive (14.3% and 7.1%, respectively). All this suggests an efficient control of the mammary SRLV infection by the humoral immune response. Nevertheless, in 14.28% of the sheep, antibodies were detected

prior to the proviral DNA, implying a less effective response in these animals. On the other hand, the presence of antibodies in goats' milk did not seem to be so efficient in controlling the SRLV presence in milk, though 12.9% of the goats became PCR-negative during the study period.

I. Introducción general

I.1. Historia

Los virus de Maedi Visna (MVV) y de la Artritis Encefalitis Caprina (CAEV) se conocen como SRLVs (Small Ruminant LentiViruses), denominación que fue propuesta y aceptada en una reunión del Grupo de Trabajo Europeo sobre ambos retrovirus que se celebró en Lyon en Septiembre de 2002 (Cost Action, 2002). La razón de que se agrupen dentro de una misma denominación es debida a que ambos virus son similares tanto estructuralmente como genéticamente y a nivel de patogenia. Además algunos estudios de epidemiología molecular han demostrado que ciertas variantes víricas que afectan normalmente a ovejas pueden infectar a cabras, y que ocurre lo mismo con las variantes caprinas, que a su vez pueden afectar a ovejas (Blackwell, 2012).

Maedi-Visna (MV) es el nombre utilizado para designar a la enfermedad crónica y generalmente subclínica en la oveja, causada por el retrovirus del mismo nombre. El virus de Maedi-Visna (MVV) fue aislado por primera vez por Sigurdadottir y colaboradores en 1964 (Sigurdadottir et al., 1964). La enfermedad se caracteriza por causar sintomatología respiratoria, nerviosa, articular y mamaria. El termino Maedi se refiere al cuadro respiratorio (neumonía intersticial) y el termino Visna alude a la forma nerviosa (enfermedad inflamatoria progresiva del sistema nervioso central).

La enfermedad recibe diferentes nombres en función de la zona geográfica, denominándose Neumonía Progresiva (Ovine progressive pneumonia- OPP) en Estados Unidos, La-Bohite en Francia, Zwoegerziekte en Holanda, Graaf Reiner en Sudáfrica, Maedi en Islandia. En España se acepta la denominación original de Maedi-Visna. En nuestro país fue descrita por primera vez en el País Vasco (González et al., 1984; Juste et al., 1987). Distintos autores han descrito que la infección llegó a los diferentes países como consecuencia del comercio internacional de animales infectados (Tabla I.1). En Islandia, por ejemplo, se asoció con la entrada en el año 1933 de 20 carneros procedentes de Alemania infectados por el virus (Palsson, 1972).

CAEV es el nombre utilizado para designar al Virus de la Artritis Encefalitis Caprina, denominándose a la enfermedad CAE o Artritis Encefalitis Caprina. CAEV fue aislado por primera vez por Crawford y su grupo en el año 1980 (Crawford et al., 1980).

Tabla I.1: Transmisión de MVV entre distintos países.

País de origen	País infectado	Año	Referencia
Alemania	Islandia	1933	Palsson, 1972
Dinamarca	Noruega	1962-1970	Krogstrup et al., 1978
Escocia	Canadá	1969	Dukes et al., 1979
Reino Unido	Hungría	1972	Suveges et al., 1973
Holanda	Francia	1956	Cottureau et al., 1977
Suecia	Finlandia	1981	Sinhoven et al., 1999; Sinhoven et al., 2000

I.2. Epidemiología

I.2.1. Prevalencia

Tanto MV como CAE son enfermedades ampliamente distribuidas a nivel mundial, aunque la prevalencia es muy superior en los países desarrollados, lo cual parece estar relacionado con el sistema de alimentación de los corderos o cabritos ya que la costumbre de mezclar la leche de todas las madres en el tanque de muestra favorece la transmisión (de la Concha-Bermejillo, 1997), y con el sistema de explotación (Leginagoikoa et al., 2006).

En Estados Unidos la prevalencia de Maedi Visna es del 26%, en Canadá del 25,1% en rebaños (Shuaib et al., 2010), y en Alemania el 51,2% de los rebaños y de 28,8% de los animales están afectados de media (Hüttner et al., 2010). En Etiopia la seroprevalencia es de 74% de las ovejas (Woldemeskel et al., 2002). Los países exentos de enfermedad son Nueva Zelanda y Australia. En España, la prevalencia varía en función de la Comunidad Autónoma, siendo del 100% en el País Vasco, del 95-98% en Aragón, Navarra, Rioja y León, del 20-30% en Ávila, Sevilla y Murcia; en Madrid se ha estimado una prevalencia en rebaños del 43,4% y del 24,5% en animales (Tabla I.2).

Con respecto a estudios de prevalencia de CAEV la prevalencia en Estados Unidos es del 31% en cabras y del 73% en rebaños (Rowe y East, 1997), en Italia se ha publicado un 81,5% de seroprevalencia (Gufler et al., 2008). En Suiza la prevalencia en cabras es del 42% (Krieg et al., 1990), y en Gales del 30% (Grewal et al., 1986). En Siria es del 12,5% (Giangaspero et al., 1992), en Turquía del 1,9% (Burgu et al., 1994), y en el Sultanato de Omán es de un 5,1% (Tageldin et al., 2012).

Tabla I.2: Seroprevalencia de MVV en rebaños y en ovejas en España.

Región	Prevalencia en rebaños	Prevalencia en animales	Referencia
País Vasco	100%	52,4%	Juste et al., 1987
Aragón	100%	52,8%	Pérez et al., 2010
Teruel	100%	15,31%	Ruz et al., 2000
Rioja, Navarra, León	95-97,8%	38,6-44,7%	Luján et al., 2001
Cataluña	90,0%	58,3%	Alba et al., 2008
Galicia	52,6%	24,99%	Lago et al., 2012
Madrid	43,4%	24,5%	García et al., 1994
Sevilla	31,3%		Artigas et al., 1999
Ávila	30%	15%	Luján et al., 2001
Castilla La Mancha	0-21%	44-96%	Leginagoikoa et al., 2006
Murcia	21,67%	13,9%	Prats y Vizcaíno, 1994

I.2.2. Transmisión

La ruta de transmisión está relacionada con los fluidos corporales, fundamentalmente exudados respiratorios y leche o calostro (Narayan et al., 1985), debido a la presencia en los mismos de monocitos y macrófagos infectados, por lo que las vías de transmisión principales son la aerógena y la lactógena (Houwens et al., 1989; Peretz et al., 1994; Blacklaws et al., 2004). No está claro si la transmisión entre animales se produce mediante la presencia de viriones libres o a través de células infectadas. La vía de transmisión aerógena es a través de las gotículas de Pflügge, motivo por el que se favorece la transmisión en condiciones de hacinamiento. De hecho, son varios los estudios que relacionan la prevalencia de MVV con el tipo de estabulación (Leginagoika et al., 2006; Perez et al., 2009; Leginagoika et al., 2010; Lago et al., 2012). Otras vías de transmisión como la transplacentaria y la seminal tienen menor importancia desde un punto de vista epidemiológico (Blacklaws, 2012). El riesgo potencial ligado a la ordeñadora y a las agujas no ha sido probado. No obstante, uno de los primeros estudios sobre SRLVs demostraba que la desinfección de las máquinas tras el ordeño de animales infectados evitaba la transmisión a animales libres de infección (Adams et al., 1983). Independientemente de la vía de transmisión y como se comentó anteriormente, el virus atraviesa la barrera mucosa e infecta a los macrófagos y a células dendríticas de la misma (Blacklaws, 2012). Las células infectadas por SRLVs en la glándula mamaria son los monocitos y las células epiteliales (Bolea et al., 2006).

I.2.3. Rango de hospedadores

Con respecto a los hospedadores, los SRLVs pueden afectar indistintamente a ovejas y a cabras, pues se han observado infecciones cruzadas tanto experimentalmente como de forma natural (Rosati et al., 1999, revisado por Blacklaws, 2012). En el 30% de los aislados se encuentran ambos virus. Estudios de epidemiología molecular han demostrado que los dos virus representan un amplio espectro de variantes que pueden afectar a ambas especies animales (Blacklaws, 2012). En cualquier caso, es más frecuente la infección de MVV en ovejas y la infección de CAEV en cabras, por lo que debe existir cierta especificidad que favorezca la transmisión homóloga. Los factores predisponentes principales que favorecen esta transmisión interespecífica se relacionan con el manejo. La habilidad de los SRLVs de saltar la barrera interespecie para producir infecciones cruzadas es inusual, pues la mayoría de los lentivirus tiene una capacidad muy limitada a la hora de crecer en células no provenientes de su especie hospedadora (Blacklaws, 2012).

I.2.4. Factores predisponentes

Los factores predisponentes a la infección por SRLVs pueden clasificarse en factores del virus y del hospedador.

- **Factores del virus:** En el caso del virus se han observado diferencias genéticas en cepas de alta virulencia y de baja virulencia (De la Concha Bermejillo, 1997).
- **Factores del hospedador:** Dependen tanto de la raza como de la susceptibilidad individual. Con respecto a la raza, hay estudios contradictorios: Smith y colaboradores en 1992 realizaron un estudio de diez años con dos razas ovinas diferentes; al cabo del tiempo, la prevalencia en ambos rebaños era similar (Smith et al., 1992). En otros laboratorios se ha demostrado que la raza puede influir en la susceptibilidad (Dawson et al., 1987), o en los cuadros clínicos desarrollados (Luján et al., 1991). Otro factor relacionado con el hospedador es la edad de los animales. Varios estudios han demostrado una asociación entre la edad y el aumento de animales seropositivos, probablemente relacionado con un mayor tiempo de exposición (Berriatua et al., 2003).

La importancia de la investigación de factores de riesgo asociados a las infecciones por SRLVs está aumentando enormemente debido a su relevancia a la hora de establecer medidas de control para reducir la incidencia de estas infecciones. Algunos estudios han encontrado relación entre la incidencia de la infección por SRLVs y el tamaño del rebaño, la edad de destete o los días de estabulación (Perez et al., 2009). Otros autores han relacionado la incidencia de SRLVs con el tiempo de estabulación, la densidad animal, la ventilación del establo y la edad (Leginagoikoa et al., 2010). Estudios previos realizados por los mismos autores mostraban que la seroprevalencia de MVV estaba relacionada con la raza y el sistema de producción (Leginagoikoa et al., 2006). Otros estudios realizados en Galicia encontraron también relación entre la presencia de infección por MVV y factores como el tamaño del rebaño, el contacto entre cabras y ovejas, o la introducción de animales nuevos al rebaño (Lago et al., 2012).

I.3. Etiología

Tanto MVV como CAEV pertenecen a la Familia *Retroviridae*, genero *Lentivirus*. Al igual que los demás miembros de esta familia, contienen dos cadenas de ARN, englobadas en una cubierta proteica denominada cápside. Como en el resto de los retrovirus, las cadenas de ARN se transforman en una doble cadena de ADN mediante la enzima Transcriptasa Inversa (RT), y gracias a este mecanismo se puede insertar en el genoma de la célula hospedadora.

Actualmente los SRLVs se han clasificado por sus relaciones filogenéticas en cinco grupos: A, B, C, D y E (Reina et al., 2009). El genotipo A se correspondería con cepas de MVV, el genotipo B se corresponde con cepas de CAEV, el C se corresponde con aislados de SRLVs de ovejas y cabras Noruegas, el genotipo D se ha identificado al analizar secuencias del fragmento *pol* de SRLVs de ovejas españolas y suizas, y finalmente el E se ha aislado en Italia (revisado por Glaria et al., 2012). En España, estudios realizados por Reina y colaboradores (2006) muestran que las cepas tanto ovinas como caprinas se encuentran dentro de los grupos A y D. Posteriormente se ha incluido a las cepas ovinas de animales con sintomatología artrítica dentro del grupo B2 de CAEV (Glaria et al., 2009).

I.3.1. La partícula vírica

La partícula vírica de los SRLVs mide entre 90 y 120 nm de diámetro y está constituida por la envoltura y el core.

La **envoltura** está formada por una membrana lipídica procedente de la célula hospedadora (por lo que básicamente está constituida por una bicapa de fosfolípidos), y por glucoproteínas codificadas por el genoma vírico, concretamente por el gen *env*. Estas glucoproteínas son la SU (proteína de superficie) o gp135SU (gp105 según De la Concha-Bermejillo, 1997) y la TM (proteína transmembrana) o gp46TM (Blacklaws, 2012) (Fig.I.1). La gp135SU es una proteína muy glucosilada que se une mediante enlaces no covalentes al extremo hidrofóbico de la proteína transmembrana (Narayan et al., 1993). Ciertos epitopos de esta molécula son reconocidos por los receptores celulares, y además pueden dar lugar a la producción de anticuerpos (Jolly y Narayan, 1989), por lo que sus modificaciones determinan la variabilidad antigénica de los diferentes aislados. En la proteína TM se han identificado cuatro epitopos inmunodominantes, tres de los cuales están asociados con la artritis clínica (Bertoni et al., 1994). La gp46TM, al ser una proteína muy conservada, se ha utilizado con éxito en técnicas de ELISA para la detección de anticuerpos. De esta proteína depende la fusión entre la envoltura vírica y la membrana lipídica de la célula hospedadora (Crane et al., 1991).

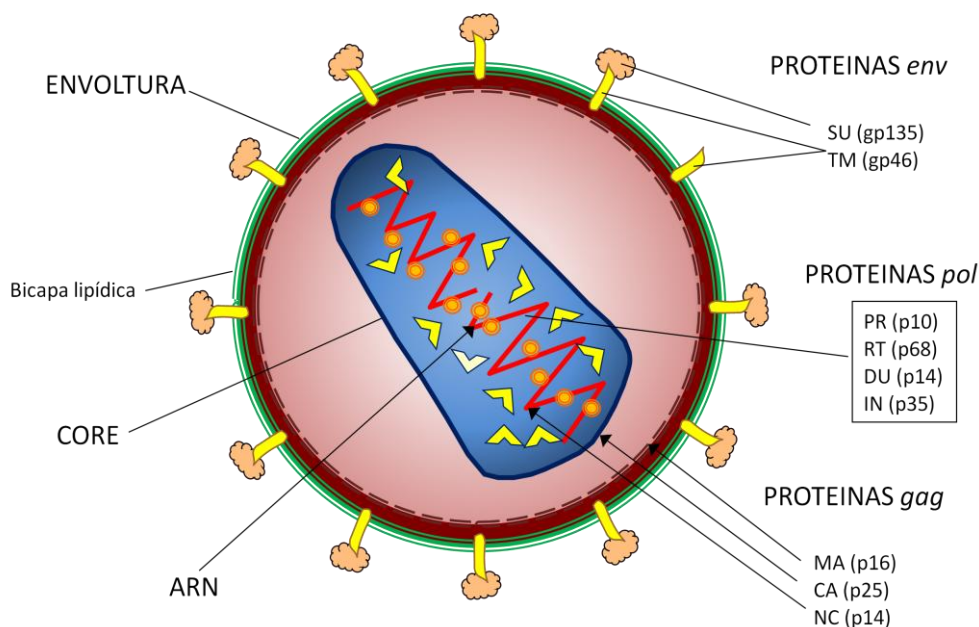


Figura I.1: Estructura general de lentivirus. SU, proteína de superficie; TM, proteína transmembrana; CA: proteína de la cápside; MA: proteína matriz; NC, proteína de la nucleocápside.

El **core**, que contiene el ARN vírico, está constituido por tres proteínas codificadas por el gen *gag*. La de mayor tamaño es la CA (proteína de la cápside) o p25CA (p24-p27 según De la Concha-Bermejillo, 1997). Ésta da lugar a la producción de anticuerpos en el hospedador, motivo por el cual se utiliza en métodos de ELISA. Las otras dos proteínas son la MA (proteína de la matriz) o p16MA y NC (proteína de la nucleocápside) o p14NC. En el interior del core se encuentran además las enzimas transcriptasa inversa, integrasa y proteasa necesarias para la transcripción e integración vírica (Fig.1).

I.3.2. Genoma y productos génicos

Los genomas de MVV y de CAEV tienen entre 9.000 y 10.000 nucleótidos (nt) (Narayan et al., 1993) y están constituidos por dos cadenas lineales de ARN de polaridad positiva con el extremo 5' metilado y el 3' poliadenilado, que contienen genes estructurales y reguladores. El ADN proviral cuenta además con unas secuencias repetidas terminales largas (*long terminal repeats*, LTRs) que contienen los elementos promotores que inician la transcripción del ADN (Pepin et al., 1998) y que juegan un papel importante en el tropismo celular (Angelopoulou et al., 2007). Posee los genes estructurales, presentes en el genoma de todos los retrovirus replicación competentes, así como una batería de genes accesorios. Los genes estructurales, nombrándoles en dirección 5' -3', son los siguientes (Fig.I.2):

- ***gag***: la semejanza entre CAEV y MVV en esta región es de un 75% (Narayan et al., 1993). Es un gen altamente conservado y que codifica las proteínas del core. Al traducirse este gen se sintetiza una poliproteína precursora (precursor de Gag) o Pr55 que durante la maduración y replicación del virus dará lugar a las proteínas p25CA, p16MA y p14NC.
- ***pol***: la semejanza de ambos virus en esta región es de un 78% (Narayan et al., 1993). Contiene la información para la síntesis de proteínas relacionadas con la transcripción del genoma vírico y síntesis de proteínas durante la replicación. A partir de *pol* se sintetiza una poliproteína precursora, precursor de Pol Pr175. Ésta a su vez se escindirá dando lugar a las proteínas proteasa (PR) o p10PR, transcriptasa inversa (RT) o p68RT, integrasa (IN) o p35IN, y dUTPasa.

- **env**: es la región en la que más difieren los dos virus, contando con sólo un 60% de semejanza (Narayan et al., 1993). Contiene la información para las glucoproteínas de la envoltura. Da lugar al precursor Env o Pr185, a partir del cual se formarán la gp135SU y la gp46TM. Esta región posee un alto grado de mutabilidad, al estar más expuesta al sistema inmunológico y estar los epitopos críticos para la infectividad al albergar de las defensas del hospedador. Al comparar la secuencia de aminoácidos de la proteína SU de diferentes aislados, se observó que las secuencias de aminoácidos diferían desde un 29,2% hasta un 36,7%, entre MVV y CAEV. Las diferencias dentro del mismo grupo oscilaron entre un 7,8% y un 20,1%, en el caso de CAEV (Valas et al., 2000). En este mismo estudio se identificó la existencia de cuatro dominios conservados, responsables del 67% de la respuesta inmunológica, y cinco regiones variables. Analizando la secuencia de la región variable 5 (V5), se halló una alta homología en función de la zona geográfica, mostrando grandes diferencias entre distintas regiones (Valas et al., 2000).

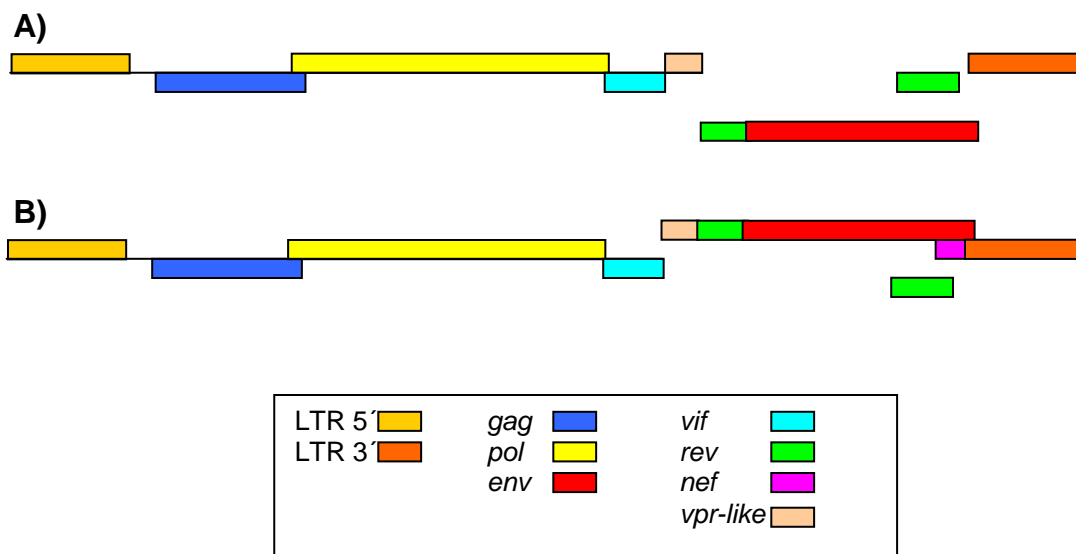


Figura I.2: Esquema de los genomas provirales de MVV (A) y CAEV (B).

Los genes accesorios reguladores se localizan entre las regiones *pol* y *env*, y contienen la información para la síntesis de proteínas reguladoras de la replicación vírica. Estos genes son:

- **vif**: cuyo producto es necesario para que el virus sea infectivo. Los virus con mutaciones en este gen están altamente atenuados y son incapaces de establecer una infección persistente (Blacklaws, 2012).

- **vpr-like:** este gen que codifica un proteína de 14 kd, inicialmente fue denominado *tat* por analogía con el de otros lentivirus, pero se ha comprobado que no tiene una clara función de transactivación ni se ha encontrado sitio activado por Tat en la región LTR del virus. Se ha propuesto que tiene una función más parecida a la desempeñada por la proteína VPR de otros lentivirus (Villet et al., 2003).
- **rev:** da lugar a una proteína (p19) que interviene en la regulación de la expresión vírica. En el caso de CAEV se forman dos isoformas de proteína Rev, que difieren en el extremo N terminal (Gazit et al., 1996).
- **nef:** este gen sólo se encuentra presente en el genoma de CAEV (Narayan et al., 1993) y es un regulador negativo.

I.3.3. Replicación

El mecanismo de replicación es semejante al de otros retrovirus. Es posible que MVV y CAEV no utilicen el mismo receptor celular para penetrar en la célula hospedadora (Blacklaws, 2012). Según algunos estudios el receptor de MVV es un proteoglicano de 30kd con una unión a un condroitinsulfato (Bruett et al., 2000). Estudios recientes han identificado un receptor manosa, que parece ser el receptor celular en ovejas (Crespo et al., 2011). Una vez ha penetrado el genoma vírico en la célula hospedadora, el ARN se transcribe en una doble cadena de ADN, paso realizado por la transcriptasa inversa. Seguidamente, el ADN es insertado en el genoma celular, mediante la proteína integrasa. De esta forma el virus se replica con la célula hospedadora, permaneciendo la infección de por vida. A partir del ADN vírico ya integrado, se sintetizarán las proteínas necesarias para la partícula vírica, utilizando los sistemas enzimáticos de la célula hospedadora. Finalmente, la envoltura vírica se formará a partir de la membrana lipídica celular, en la que se integrarán las glucoproteínas gp135SU y gp46TM.

Debido a su grado de replicación *in vitro* y efecto citopático, los SRLVs se clasifican en dos variantes víricas (Hoztel y Cheevers, 2002):

- **líticas de replicación rápida:** inducen rápidamente la formación de sincitios; el número de partículas víricas aumenta rápidamente y tienen efecto lítico. Estas

cepas son las causantes de la sintomatología más grave de la enfermedad (Lairmore et al., 1987).

- no líticas de replicación lenta: el efecto citopático producido, tanto en los macrófagos como en las células de la membrana sinovial, es pequeño y la sintomatología en los animales es leve o nula (De la Concha-Bermejillo, 1997). Estas cepas se encuentran frecuentemente en virus de tipo CAEV.

I.4. Patogenia y tropismo celular

Una vez que el virus ha ingresado en el organismo se desarrolla una breve fase de viremia (fase de viremia postinfección). En este estadio se producen alteraciones inmunopatológicas transitorias. Una vez localizadas las células diana, se integra en su genoma (Amorena et al., 2001). Los SRLVs tienen tropismo *in vivo* por los monocitos, macrófagos y células dendríticas (Ryan et al., 2000). Los lentivirus de pequeños rumiantes pueden afectar a otras células *in vivo* en el sistema nervioso, como la microglia y células endoteliales (Blacklaws, 2012) así como fibroblastos y células epiteliales de otros tejidos (Georgsson et al., 1989). Estas células pueden actuar como reservorio del virus, como es el caso de las células epiteliales de la glándula mamaria y que contribuyen a la transmisión entre la madre y la cría durante la lactación (Blacklaws, 2012).

Una vez que los SRLVs han entrado en el organismo, infectan a macrófagos y células dendríticas de la mucosa pulmonar o intestinal (Fig.I.3). Las células dendríticas migran a los linfonódulos donde el virus es transferido a los macrófagos, que saldrán del linfonódulo y diseminarán la infección (revisado por Blacklaws, 2012). Se cree que los macrófagos infectados penetran en la médula ósea donde pueden afectar a las células mieloides, o células del estroma, lo que produciría una continua producción de células infectadas y se traduciría en la infección crónica a lo largo de toda la vida del animal (Blacklaws, 2012). La replicación en monocitos y macrófagos no se produce hasta la maduración de éstos en los órganos diana (Narayan et al., 1983). Por tanto los macrófagos inmaduros actúan como un “caballo de Troya”, pues el virus se acantona y escapa de la respuesta inmunológica celular y humoral. La infección permanece en fase de latencia, por un periodo de tiempo que depende de la cepa

vírica (Lairmore et al., 1988) y, fundamentalmente, de la susceptibilidad individual (de la Concha-Bermejillo et al., 1995).

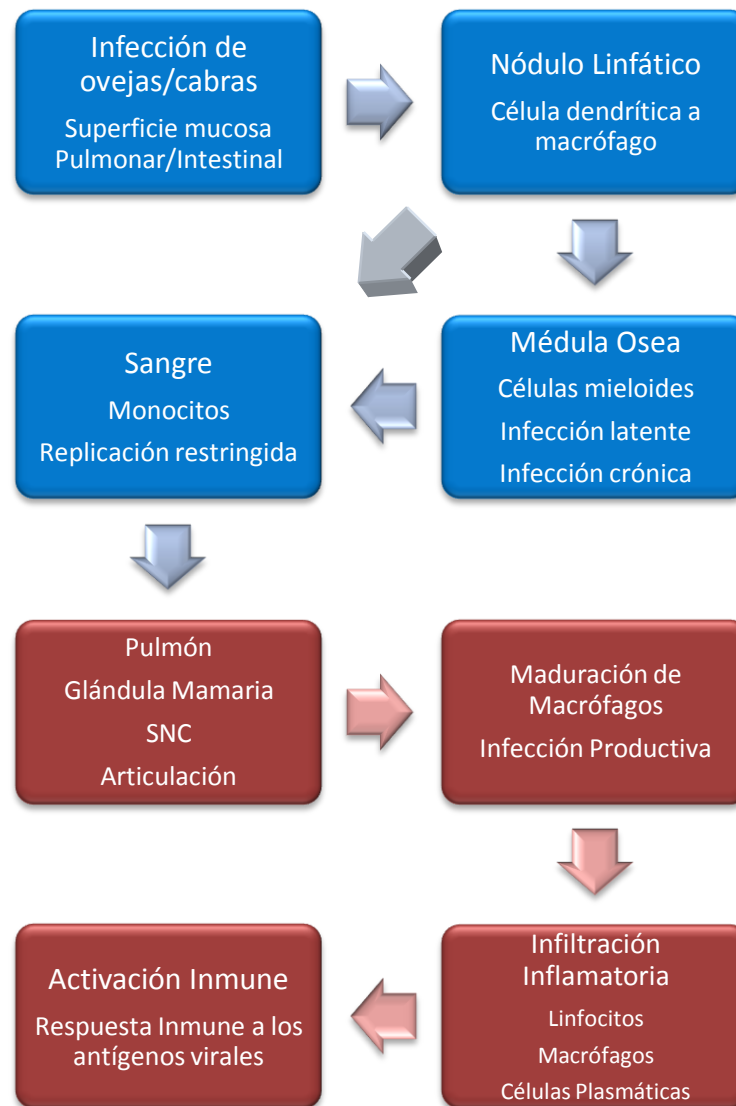


Figura I.3: Esquema de Patogenicidad de SRLVs. Se muestran en recuadros rojizos las fases que tienen lugar en los órganos diana (adaptado de Blacklaws, 2012).

Las células infectadas son transportadas a los órganos diana y una vez maduren, se producirá la replicación vírica. Este mecanismo produce que la replicación de SRLVs en los tejidos sea constante y, por tanto, la respuesta inmunológica que se genera en respuesta a esta replicación cause una inflamación crónica que da lugar a los cambios patológicos observados

en los tejidos diana de los animales infectados por SRLVs (Blacklaws, 2012). En consecuencia, la enfermedad inflamatoria multisistémica propia de las infecciones por SRLVs es inmunopatogénica. El cambio principal que se produce en los tejidos afectados es la infiltración de células mononucleares (linfocitos, macrófagos y células plasmáticas). Los linfocitos se acumulan organizándose como folículos linfoides (Blacklaws, 2012).

La fase final de la patogenia comienza cuando se desarrolla la enfermedad clínica. Llegado a este punto, y dependiendo del cuadro que desarrolle, el animal puede morir en poco tiempo o permanecer de forma crónica (Amorena et al., 2001). A pesar del alto grado de infección que puedan presentar algunos rebaños, las manifestaciones clínicas suelen ser poco aparentes, pues hay muchos factores que influyen en la patogenia, fundamentalmente la cepa vírica, la edad y cría del animal, la ruta de exposición, las infecciones secundarias y las condiciones de manejo.

I.5. Respuesta inmunológica

Los macrófagos infectados expresan proteínas víricas en su superficie, que se asocian con el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Esta unión es reconocida por los linfocitos T, en los que se estimula la producción de un tipo especial de interferón, LV/IFN (lentivirus (LV)/ $\alpha 2$ interferón) (Kennedy-Stoskopf et al., 1987; Lairmore et al., 1988), que es probablemente una mezcla de los IFN de tipo I y de tipo II (IFN-gamma) (Bertoni et al., 2010). El LV/IFN atrae a otras células inflamatorias al foco y de esta forma se mantiene el ciclo de replicación vírica y la inflamación crónica. En algunos estudios se ha observado que el LV/IFN inhibe la maduración de monocitos a macrófagos, por lo que modula la replicación vírica (Zink et al., 1989). Por tanto, la producción del LV/IFN, al retrasar la maduración de monocito a macrófago (Blacklaws, 2012), hace que el proceso se perpetúe, de forma que llegan pocas células inflamatorias al foco pero durante mucho tiempo, instaurándose un cuadro de inflamación crónica y progresiva. Esta lesión es la misma en todos los órganos diana y es la responsable de la distinta sintomatología que desarrollan los animales.

I.5.1. Respuesta inmunológica humoral

Como consecuencia de la infección vírica, el organismo animal reacciona produciendo anticuerpos. Los primeros pueden aparecer a las tres semanas de la infección experimental y son contra p25CA. Dos semanas después se sintetizan anticuerpos contra gp46TM (De la Concha-Bermejillo, 1997), así como también frente a p14NC y a p16MA. Finalmente, se generan anticuerpos contra gp135SU. Los anticuerpos generados contra las proteínas Env son interesantes pues bloquean la unión de estas proteínas con el receptor celular y tienen actividad neutralizante. Pero los anticuerpos neutralizantes se producen de forma lenta, tienen baja afinidad y los títulos son bajos (Blacklaws, 2012). Además se duda de que sean funcionalmente importantes *in vivo*, ya que los SRLVs son virus asociados a células y pueden diseminarse por contacto célula-célula, ya que inducen sincitios, habiendo así pocos virus que neutralizar y su neutralización puede no afectar a la propagación y diseminación vírica (revisado en Bertoni y Blacklaws, 2010). Si bien la respuesta humoral no es suficiente para eliminar la infección del virus, permaneciendo ésta de por vida, algunos estudios han demostrado que limita la extensión del virus (Andresdottir et al., 2002).

Por otra parte, los anticuerpos generados por la infección por SRLVs pueden llegar a favorecer la infección, ya que los complejos virión-anticuerpo pueden ser internalizados por los macrófagos o por las células dendríticas, que poseen receptores Fc para los anticuerpos (revisado en Blacklaws, 2012).

I.5.2. Respuesta inmunológica celular

La respuesta celular se produce entre una y cuatro semanas post-infección (Larsen et al., 1982). Algunas investigaciones han demostrado que los monocitos y macrófagos infectados pueden activar a linfocitos T citotóxicos específicos (Reyburn et al., 1992; Lee et al., 1994). Las alteraciones inmunopatológicas en los órganos diana se deben al aumento de los linfocitos T CD8+ y a la inversión del cociente CD4/CD8 (Amorena et al., 2001). A nivel pulmonar, el aumento de linfocitos T CD8+ se utiliza como indicador *in vivo* del grado de lesión y es el responsable del cuadro típico de neumonía intersticial crónica (Amorena et al., 2001). En la glándula mamaria se produce también la infiltración linfocitaria, localizándose los linfocitos T CD8+ alrededor de la barrera epitelial (Narayan et al., 1985). La replicación

vírica se desarrolla activamente en las células epiteliales del acini mamario (Lujan et al., 1995, citado por Amorena et al., 2001). En el líquido cefalorraquídeo y en el encéfalo se observa la inversión del cociente CD4/CD8 (Amorena et al., 2001). Finalmente, en las articulaciones el aumento de linfocitos T CD8+ se produce en la membrana sinovial y en el líquido articular (Amorena et al., 2001).

I.6. Cuadro clínico

Maedi-Visna, al igual que la Artritis Encefalitis Caprina, cursa con cuadros respiratorio, nervioso, mamario y articular. Aunque normalmente el proceso es subclínico, un pequeño porcentaje de los animales pueden presentar alguno de los cuadros citados anteriormente e incluso todos. Normalmente los cuadros respiratorio y mamario son predominantes en MV mientras que el nervioso y articular son más importantes en CAE.

I.6.1. Cuadro respiratorio

Es la forma de presentación más frecuente. Afecta a animales adultos de más de dos años de edad y una vez que los síntomas son aparentes la esperanza de vida del animal no supera el año de vida (Watt et al., 1994). La primera fase de la enfermedad suele pasar desapercibida, aunque puede agravarse por deficiencias en el manejo. Se observa intolerancia al ejercicio con retraso en la marcha. Posteriormente se presenta un cuadro de disnea en reposo, acompañado de respiración abdominal, extensión del cuello, dilatación de los ollares y respiración con la boca abierta (Luján et al., 2001). A medida que progresa la enfermedad el animal padece anorexia, pérdida de peso, y finalmente caquexia. Sólo muestra exudado nasal cuando existen infecciones bacterianas secundarias.

Las lesiones macroscópicas no son muy evidentes. Están afectados los pulmones y los nódulos linfáticos regionales. A nivel pulmonar se observa hipertrofia, hasta tres veces el tamaño normal, aspecto tumefacto, bordes redondeados (más evidentes en los lóbulos diafragmáticos), consistencia gomosa, color amarillo grisáceo, con punteado grisáceo subpleural, y superficie seca. En el caso de contaminaciones bacterianas secundarias se pueden apreciar regiones de color rojizo en la zona craneoventral, de aspecto húmedo y

marcado patrón lobulillar. Debido a la semejanza de esta lesión con la Adenomatosis Pulmonar Ovina es conveniente realizar un diagnóstico diferencial con la misma.

A nivel histológico se puede apreciar neumonía intersticial crónica caracterizada por infiltración de linfocitos, monocitos, macrófagos y células plasmáticas en los septos interalveolares, lo que contribuye al engrosamiento de los mismos y a la hiperplasia de las fibras musculares lisas de las paredes alveolares, que favorece la disfunción pulmonar (Luján et al., 2001). Otra lesión característica es la hiperplasia linfoide difusa (fundamentalmente por linfocitos T CD4+ y CD8+) (Watt et al., 1992), que causa el punteado grisáceo subpleural (patognómico en MVV). A medida que avanza la enfermedad las lesiones se fibrosan (Luján et al., 2001).

I.6.2. Cuadro mamario

Es el segundo en importancia, debido a las pérdidas económicas y a la frecuencia de aparición. En algunas razas puede ser más frecuente que el respiratorio, como es el caso de la Rasa Aragonesa (Luján et al., 1991). Afecta a animales adultos entre los 3 y 5 años de edad, pero también se ha observado en animales de un año de edad (Houwers et al., 1988). Se produce una mastitis subclínica, indurativa, crónica, difusa, bilateral y no dolorosa, con tumefacción de nódulos linfáticos mamarios (Fig.3). Las lesiones sólo son evidentes tras el parto (Luján et al., 2001). Se trata de una mastitis intersticial crónica caracterizada por infiltración de células mononucleares alrededor de acinis mamarios y conductos galactóforos, produciendo descamación de los mismos. Esto a su vez genera hiperplasia, vacuolización y descamación del epitelio ductal. Finalmente, la lesión se fibrosa, provocando induración mamaria y estenosis del conducto galactóforo.

La producción de leche puede estar disminuida y sus características macroscópicas (color y consistencia) no varían (De la Concha Bermejillo, 1997).

I.6.3. Cuadro articular

Es la forma de presentación de la enfermedad menos frecuente en MV, ocurriendo lo contrario en el caso de CAE. Se ha descrito con mayor frecuencia en la zona de Aragón

(Biescas et al., 2006). Afecta a animales entre 2 y 3 años de edad. El signo clínico más evidente es la cojera, pues fundamentalmente están afectadas las articulaciones carpal y tarsal. En menor medida también pueden estar afectadas las articulaciones atlanto-occipital y coxofemoral (Rowe y East, 1997).

Lo primero que se observa es edema y congestión de la membrana sinovial y cápsula articular, lo que provoca un engrosamiento de ambas estructuras (Rowe y East, 1997; Luján et al., 2001). El cartílago articular se erosiona y el líquido articular puede aparecer turbio.

Hay proliferación de la membrana sinovial e infiltración subsinovial de células mononucleares, manguitos perivasculares y depósitos de fibrina en la membrana sinovial. También pueden verse afectadas estructuras periarticulares (cápsula articular y tejido conjuntivo periarticular) en los que se aprecian áreas necróticas y calcificaciones. Finalmente la artrosis evoluciona a anquilosis debido a la calcificación o fibrosis.

I.6.4. Cuadro nervioso

Es poco frecuente en el caso de las ovejas, observándose el mayor número de casos en animales estabulados (Gómez et al., 1999, citado por Luján et al., 2001). Afecta a animales mayores de dos años, aunque en algunas razas como la Assaf se puede presentar en animales de menos edad. Recientemente se ha dado un brote de infección por MVV en la zona de León donde la lesión principal ha sido encefalitis o encefalomiелitis (Benavides et al., 2006a, 2006b, 2009).

En las cabras es menos frecuente que el cuadro articular y se caracteriza por una leucoencefalomiелitis en animales de 2 a 6 meses de edad (Cork et al., 1980, citado por Rowe y East, 1997). El cuadro se caracteriza por incoordinación, ataxia del tercio posterior, que puede progresar afectando al anterior, y finalmente se observa decúbito, postración e incapacidad para levantarse (Rowe y East, 1997; Luján et al., 2001). Estos síntomas se presentan durante seis meses a un año, acompañados, como en el resto de los cuadros, de adelgazamiento progresivo y, en algunos casos, de caquexia (Luján et al., 2001).

En el encéfalo se aprecian áreas de malacia en determinadas zonas de la sustancia blanca, así como engrosamiento granular de plexos coroideos y enturbiamiento meníngeo.

Histológicamente se observan infiltrados subependimarios de linfocitos, monocitos y macrófagos (Luján et al., 2001). En la médula espinal se desarrolla mielitis no purulenta uni o bilateral (Luján et al., 2001).

I.7. Diagnóstico

No existe un método de diagnóstico estándar (“*gold standard*”). El diagnóstico clínico y anatomopatológico se complementa con técnicas de diagnóstico indirectas, de detección de anticuerpos, y/o directas, de detección del virus.

I.7.1. Diagnóstico clínico-epidemiológico

Basado en la presencia de los distintos cuadros clínicos (forma mamaria, articular, respiratoria y nerviosa), edad de presentación y cronicidad de los procesos.

I.7.2. Diagnóstico diferencial

La forma pulmonar de la enfermedad se puede confundir con la adenomatosis pulmonar ovina (APO). Los dos procesos se diferencian por la presencia de un abundante líquido seroso por los ollares del animal al bajar la cabeza en el caso de APO o postmortem por las lesiones macro y microscópicas (Luján et al., 2001).

La forma mamaria se debe diferenciar de la agalaxia contagiosa producida por *Mycoplasma agalactiae*. Aunque ésta suele cursar además con queratoconjuntivitis y artritis a nivel de rebaño, el cuadro mamario es muy similar y es necesario el análisis histológico para confirmar que se trata de una enfermedad u otra. En el caso de los SRLVs, no se encuentran lesiones necróticas (Luján et al., 2001), ni varían las características organolépticas de la leche.

La forma nerviosa debe diferenciarse de la listeriosis, pero ésta normalmente es de carácter estacional, y suele presentar lesiones diferentes; de la enfermedad de Aujeszky y del

Scrapie, que suelen cursar con un intenso prurito; y de la cenurosis y el Louping-ill, que también se diferencian por el tipo de lesión (Luján et al., 2001).

Y finalmente, la forma articular: aunque es poco frecuente, cuando se produce se suele confundir con problemas bacterianos (Luján et al., 2001).

I.7.3. Diagnóstico anatomopatológico

Se basa en la observación de las alteraciones macroscópicas y microscópicas propias de la enfermedad descritas anteriormente. Sólo es fiable en el caso del cuadro pulmonar. El resto de los cuadros son más inespecíficos, por lo que el examen histológico es únicamente orientativo (Juste et al., 2001).

I.7.4. Diagnóstico serológico

Dado lo difícil que es diagnosticar las infecciones por SRLV mediante observaciones clínico-epidemiológicas y anatomopatológicas, una alternativa es alguno de los distintos tipos de diagnóstico serológico. Los intentos por desarrollar un método "*gold standard*" para el diagnóstico de SRLVs no han tenido éxito. Los métodos recomendados internacionalmente son Inmunodifusión en gel de agar (IDGA) y ELISA (OIE 2008; Reina et al., 2009). Los primeros test serológicos desarrollados para el diagnóstico de SRLVs fueron radioinmunoprecipitación (RIPA) e IDGA y suelen ser considerados como estándar de referencia para la comparación (Herrmann-Hoesing et al., 2010). Algunas de las técnicas diagnósticas serológicas usadas en el diagnóstico de SRLVs se describen a continuación, ampliando en el Capítulo I la descripción de las técnicas ELISA y PCR, empleadas en esta tesis.

- La **Inmunodifusión en gel de agar** ha sido ampliamente utilizada y aceptada como prueba de referencia (Herrmann-Hoesing et al., 2010). Tiene una especificidad del 100%. Los inconvenientes en la utilización de esta prueba son la baja sensibilidad en comparación con ELISA (Toft et al., 2006) y la interpretación subjetiva de la misma (Herrmann-Hoesing et al., 2010). El test más utilizado contiene p25CA y gp135SU (Juste et al., 2001), apareciendo dos bandas de precipitado. Debido a la similitud

antigénica y genómica entre MVV y CAEV, se puede aplicar la prueba para los dos virus (Juste et al., 2001) e incluso estudios recientes afirman que es más sensible para la detección de CAEV que para MVV (Brinkhof et al., 2007).

- En la **Inmunoprecipitación** los componentes peptídicos y proteicos de los tejidos son solubilizados y desnaturalizados mediante detergentes. Los anticuerpos se añaden a los lisados celulares u homogenizados tisulares donde se forman los complejos antígeno-anticuerpo. Estos complejos son precipitados por reacción con una fase sólida inmuoabsorbente formada habitualmente por un segundo anticuerpo unido a Sepharosa (resina particulada insoluble) o bien por proteína A (proteína de la superficie de *Staphylococcus aureus* con gran afinidad por el fragmento Fc de las Ig) unida a Sepharosa. Una vez sedimentados por centrifugación los complejos son lavados y detectados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) (Knowles et al., 1997). La técnica no ha sido evaluada concienzudamente, pero es una buena prueba para confirmar los resultados dudosos.
- El **Western blot** consiste en la separación de las proteínas víricas por SDS-PAGE; posteriormente se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, y se enfrentan al suero de la oveja. Caso de existir anticuerpos en el suero, a su vez quedarán fijados a la membrana de nitrocelulosa en las bandas donde haya migrado la proteína vírica (Knowles et al., 1997). Hay un estudio en el que se describe una sensibilidad del 94% y una especificidad del 100% (de Martini et al., 1999), aunque este resultado no es concluyente porque en él se utilizó un número bajo de animales, pero en general se considera una buena prueba de referencia (de Andres et al., 2005; Herrmann-Hoesing et al., 2010).
- **ELISA**: Las distintas variantes de esta técnica se describen en el Capítulo I.

I.7.5. Diagnóstico etiológico

Los métodos diagnósticos etiológicos detectan el virus destacando:

- **Co-cultivo:** consiste en la replicación *in vitro* del virus, partiendo de una muestra sospechosa de estar infectada por MVV y una línea celular capaz de permitir dicha replicación. Las células más utilizadas son los fibroblastos, células del plexo coroideo (Sigurdsson et al., 1960, citado por Juste et al., 2001) y células de la membrana sinovial caprina (Klevjer-Anderson and Cheevers, 1981; Da Silva et al., 1997). Si bien es definitiva en el caso de resultar positiva, tiene como inconvenientes su laboriosidad, alto coste económico y la posibilidad de falsos negativos, lo que hace inviable su utilización rutinaria (Juste et al., 2001).
- **Inmunohistoquímica:** Se basa en la detección de antígeno vírico en los tejidos afectados mediante el uso de anticuerpos marcados (Bolea et al., 2006). Como inconvenientes tiene el que es una técnica cara y laboriosa, y que ha de realizarse *post mortem*.
- **Hibridación in situ:** Consiste en la detección de ácidos nucleicos víricos mediante sondas oligonucleotídicas marcadas radiactivamente o con fluorocromos (Amorena et al., 1997). Al igual que en el caso anterior es una técnica de alto coste económico y laboriosa lo que hace inviable su utilización rutinaria.
- **PCR (reacción en cadena de la polimerasa):** Con el tiempo se han desarrollado diferentes técnicas de PCR. En el Capítulo I se describen las diferencias entre ellas.
- **PCR a tiempo real o cuantitativa:** En los últimos años se han desarrollado técnicas de PCR cuantitativa a tiempo real (Brinkhof et al., 2008; Murphy et al., 2012). Sin embargo, estas técnicas solo funcionan con determinadas cepas víricas, pero no con aquéllas cuyo genoma ha sufrido mutación, por lo que su uso en diagnóstico rutinario puede ser complicado (Reina et al., 2009).
- **RT-PCR:** Pretende evidenciar partículas víricas en el medio extracelular, y por tanto, se parte de ARN vírico, que es transcrito a una doble cadena de ADN mediante transcriptasa inversa comercial. A partir de este punto, todas las reacciones son iguales que en la PCR. Como ventaja hay que mencionar que se amplifica directamente el virus, pero los niveles de viriones de MVV extracelulares libres son bajos por lo que es más efectiva la amplificación a partir de ADN.

I.8. Importancia Económica

A nivel económico se producen pérdidas debido al sacrificio de los animales afectados y al gasto asociado a la reposición. Por otra parte, los animales infectados crónicamente evolucionan a caquexia que, junto con los otros signos clínicos que se han descrito, afecta a la producción y el bienestar animal. La relación existente entre la disminución en los parámetros productivos y la infección por SRLVs es discordante. Algunos estudios muestran una reducción de la productividad (Dohoo et al., 1987; Pekelder et al., 1994), mientras que en otros estudios no se aprecia diferencia en la producción de los animales infectados (Legrottaglie et al., 1999; Dungu et al., 2000; Arsenault et al., 2003; Kenigswald et al., 2009).

I.9. Tratamiento y profilaxis

Como en el caso de otras retrovirosis, no existe un tratamiento eficaz ni una vacuna efectiva frente a los SRLVs (Blacklaws, 2012) por lo que la única manera de erradicar la enfermedad es mediante unas buenas medidas profilácticas. Al igual que otras enfermedades provocadas por retrovirus, puede ser tratada con AZT, inhibiendo tanto a la transcriptasa inversa como la apoptosis generada por MVV (Bellet et al., 2004). También se ha demostrado que derivados de los 2',3'dideoxynucleótidos (ddN), fosfonoformato e interferón-alfa inhiben la replicación *in vitro* (Juste et al., 2001). El interferón tau inhibe la replicación vírica e incrementa los linfocitos T CD8+, pero la aplicación diaria en los rebaños hace su utilización bastante compleja (De la Concha-Bermejillo et al., 2000).

En Islandia la infección se erradicó separando el Este del país (seronegativo) del Oeste (seropositivo) mediante una verja de Norte a Sur. Sacrificaron a todos los animales de las áreas afectadas reponiendo con animales negativos. Finalmente aplicaron medidas muy estrictas para el comercio de animales para evitar la transmisión de la infección (Peterhans et al., 2004). Otros países europeos, además de Estados Unidos y Canadá, han aplicado medidas similares a las utilizadas en Islandia (Reina et al., 2009) con resultado satisfactorio. Como paso previo para un programa de control de las infecciones por SRLVs se debe empezar por un diagnóstico precoz, y posterior erradicación de los animales afectados

Las medidas que se deben aplicar varían en función de los recursos financieros y de manejo, los niveles de seroprevalencia del país y del rebaño, la disponibilidad de animales seronegativos acreditados, de la preocupación de los ganaderos y de la limitación del comercio de animales infectados.

I.9.1. Sistemas de control y/o erradicación

Debido a las diferencias existentes en los distintos países de la Unión Europea en cuanto a la prevalencia, tamaño de explotación, estructura de razas y prácticas ganaderas, no se puede aplicar un único programa estandarizado a nivel europeo para la prevención y erradicación. Por lo tanto, los programas deben ser regionales, aunque sí se debe establecer una política común para controlar el comercio de animales infectados y productos potencialmente infecciosos. Las siguientes son algunas de las estrategias que se han seguido para el control de la infección (Peterhans et al., 2004).

- **Vaciado sanitario de rebaños con animales seropositivos y reposición con animales seronegativos acreditados.** Está recomendado sobre todo cuando hay una gran prevalencia de la enfermedad, y fue aplicado con éxito en Islandia. Aunque sería una medida muy efectiva para erradicar la enfermedad, requiere indemnizar a los ganaderos por animal sacrificado y económicamente es poco viable. Por otra parte, es difícil certificar con plenas garantías que el ganado de reposición es auténticamente negativo. Esta técnica ha sido empleada con éxito en Polonia, Suiza, Bélgica y Malta (Reina et al., 2008).
- **Sacrificio de animales seropositivos y sustitución por animales seronegativos garantizados.** Puede realizarse en rebaños pequeños con baja prevalencia. Como medida complementaria debería sacrificarse la progenie de los animales positivos. Se ha aplicado con éxito variable en Estados Unidos, Finlandia y Francia (Reina et al., 2008). En los rebaños donde la tasa de seroconversión es menor que la tasa de reposición se puede proceder a sacrificar sólo los animales con signos clínicos, sustituyéndolos por animales seronegativos. Se ha aplicado con éxito en España (Berriatua et al., 2003).
- **Segregación de los animales de la explotación en dos rebaños, uno seropositivo y otro seronegativo.** El rebaño seronegativo sólo se deberá reponer con animales

seronegativos. Se realizan chequeos serológicos cada seis meses y si se produce seroconversión el animal pasa automáticamente al rebaño seropositivo. Se intenta de esta forma reducir o erradicar el rebaño positivo. Para ello las condiciones de manejo deben ser distintas en ambos rebaños, lo que supone un mayor coste por el incremento de mano de obra. Ha sido aplicada con éxito en Holanda (Reina et al., 2008).

- **Separación de las crías de las madres tras el parto y alimentación con calostro y leche de ovejas o cabras libres de la infección.** Esta medida sólo es aconsejable si el valor genético de los animales justifica el gasto del incremento de las medidas de manejo e higiene. Hay que tener en cuenta el porcentaje de animales que se infectan por vía transplacentaria, por lo que no se puede erradicar del todo la infección. También puede someterse el calostro a un tratamiento térmico de 56°C durante una hora y emplearlo para alimentar a los recién nacidos. Esta técnica fue descrita por Sinhoven en cabras positivas a CAEV, observándose una reducción de la seroconversión muy significativa (Sinhoven et al., 2000).
- **Selección genética de animales resistentes a la infección.** Algunos estudios sugieren que existe un componente hereditario relacionado con la resistencia a la infección (Berriatua et al., 2003).

Otras medidas son crear laboratorios de referencia certificados para estandarizar los criterios de infección, usar pruebas de diagnóstico relevantes con un protocolo consensuado, y, finalmente, luchar por que la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) refuerce la regulación de control de SRLVs. La OIE regula el control de SRLVs para el comercio internacional de pequeños rumiantes destinados a la reproducción y a los machos que ingresen en un centro de inseminación artificial. Se exige que no presenten signos clínicos en el momento del embarque, que los animales mayores de un año sean negativos a la prueba diagnóstica de SRLVs en los 30 días anteriores al embarque y que procedan de rebaños libres de la enfermedad durante los tres últimos años (Reina et al., 2009).

II. Objetivos

Es difícil diagnosticar las infecciones por SRLVs, pero su detección temprana es importante para poder establecer medidas de control y prevención eficientes (Reina et al., 2009). Por lo tanto, es interesante disponer de métodos de diagnóstico más adecuados a la realidad de la infección por estos lentivirus, teniendo en cuenta los gastos económicos que conllevan y la facilidad de su empleo en distintos sistemas de producción. Por ello, el objetivo inicial de esta tesis fue la comparación entre los dos métodos más empleados en la actualidad, ELISA y PCR, aplicados en distintas muestras (leche o sangre), y su utilidad para determinar la prevalencia en rebaños ovinos y caprinos con diferentes sistemas de explotación y manejo. El estudio se planteó en rebaños de la región central de la Península Ibérica, ya que se disponen de pocos datos de prevalencias de SRLVs en la misma. Sin embargo, a la vista de los resultados obtenidos en este primer objetivo se plantearon una serie de objetivos secundarios en los que se analizaba la influencia de varios factores sobre la prevalencias obtenidas y se hacía un seguimiento de los animales incluidos en el estudio. Por tanto, los objetivos de esta tesis fueron los siguientes:

1. Comparar la utilidad de la leche para detectar la infección por SRLV mediante las técnicas más habituales empleadas para el diagnóstico laboratorial de SRLV (PCR y ELISA). Para ello se compararon los resultados obtenidos en sangre y leche de ovejas y cabras mediante dos técnicas diferentes de PCR (que detectan *pol* o *LTR* del virus) y una técnica de ELISA que detecta anticuerpos específicos.
2. Estimar la seroprevalencia (mediante ELISA) y la prevalencia total (mediante ELISA y PCR) de SRLVs en la zona central de la Península Ibérica, utilizando muestras de leche de ovejas y cabras, una vez que se había demostrado que las muestras de leche para el diagnóstico de los SRLV son tan válidas como las de sangre.
3. Explorar qué factores de riesgo pudieran estar favoreciendo la infección, a fin de establecer medidas eficientes de control de la infección. Además se propuso explorar el efecto de la infección por SRLVs en la productividad animal, y el efecto en la calidad de la leche, tanto en ovejas como en cabras.
4. Seguir la evolución de la infección por SRLVs en el tiempo, tanto con ELISA como con PCR, para intentar entender si la discordancia obtenida por ambas técnicas estaba relacionada de algún modo con la evolución de la infección o se debiera simplemente a la técnica diagnóstica en sí misma.

El desarrollo y consecución de estos objetivos se presentan en tres apartados diferentes, que se desarrollan a continuación:

III. Estudio comparativo de métodos diagnósticos para la detección de Lentivirus de Pequeños Rumiantes y el estudio de su prevalencia en ovejas y cabras de la región central de la Península Ibérica

IV. Factores asociados a la infección por Lentivirus de Pequeños Rumiantes

V. Estudio del seguimiento en el tiempo de la infección por Lentivirus de Pequeños Rumiantes

*III. Estudio comparativo de métodos
diagnósticos para la detección de Lentivirus
de Pequeños Rumiantes y el estudio de su
prevalencia en ovejas y cabras de la región
central de la Península Ibérica*

III.1. Introducción

Las infecciones por lentivirus de pequeños rumiantes son difíciles de diagnosticar, incluso por técnicas laboratoriales. Para su diagnóstico se han propuesto tanto técnicas de detección serológica como de detección vírica. Las técnicas diagnósticas serológicas basadas en la detección de anticuerpos se suelen aplicar en muestras de sangre. Pero es posible que debido a la circulación de anticuerpos en el animal y a su presencia en otros fluidos se pueden detectar también en leche. Así mismo se describió en Introducción que uno de los cuadros clínicos producidos por SRLVs es la mastitis y que una vía importante de transmisión del virus es por la leche, haya o no sintomatología mamaria, por lo que en teoría debería ser ésta la muestra de elección para el diagnóstico por PCR. Por otra parte, el virus infecta células epiteliales mamarias, que a no ser que haya descamación, no tendrían por qué estar en elevado número en la leche. Por tanto en este apartado exploraremos la utilización de muestras de leche para el diagnóstico de los lentivirus de los pequeños rumiantes. Además compararemos diferentes técnicas diagnósticas en muestras de leche tanto de ovejas como de cabras.

Dentro de las técnicas serológicas el método ELISA es el que ha alcanzado mayor difusión. Existen en la actualidad más de 30 publicaciones describiendo técnicas de ELISA para la detección de SRLVs (de Andres et al., 2005). Estas técnicas emplean proteínas víricas de aislados, proteínas recombinantes o péptidos sintéticos de p25CA, p16MA, p14NC, gp46-50TM. Se han desarrollado ensayos tanto para MVV como para CAEV, que se diferencian en la naturaleza del antígeno (de Andres et al., 2005). Los más usados son ELISA indirectos, que utilizan anticuerpos marcados que reaccionan con los anticuerpos anti-SRLV presentes en el animal infectado. De entre los distintos tipos de ELISA desarrollados cabe destacar el ELISA recombinante que usa proteína recombinante y/o péptidos sintéticos (de Andres et al., 2005) y ELISA de virus completo. Actualmente existen varios test de ELISA comerciales. Como ventajas de la técnica ELISA en general cabe citar que es un método de diagnóstico objetivo, permite procesar gran número de muestras y se puede incrementar la sensibilidad si se combinan proteínas del core, p25CA, y de la envoltura, gp46-50TM (Saman et al., 1999; Varea et al., 2001). Como inconveniente, se ha demostrado su escasa sensibilidad a la hora de detectar anticuerpos en las primeras fases de la infección frente a diferentes genotipos del virus (Lacerenza et al., 2006). Debido a esto, a la hora de desarrollar campañas de control es

recomendable el desarrollo de ELISA específicos en función de la cepa predominante en esa zona geográfica (Reina et al., 2009).

Si la técnica ELISA busca detectar el efecto de la infección, los anticuerpos, otras técnicas buscan detectar el propio virus o su genoma, como se expuso en Introducción. De entre estas últimas técnicas, la reacción en cadena de la polimerasa o PCR ha alcanzado en las últimas dos décadas los requisitos para poder ser empleada de forma rutinaria en los laboratorios. Con el tiempo se han desarrollado diferentes técnicas de PCR para el diagnóstico de MVV. Algunas se basan en la amplificación de fragmentos de ADN ampliamente conservados entre los retrovirus, las secuencias LTR (Extramiana et al., 2002). Otras se basan en la amplificación de genes específicos de los SRLVs como la región *pol* (Eltahir et al., 2006). También cabe destacar la técnica de PCR desarrollada por Gil et al. (2006) que amplifica la región *gag*.

Al mismo tiempo, los estudios de prevalencia son cada vez mas importantes, pues es necesario conocer le extensión de la infección para poder establecer medidas de control adecuadas, por lo que la segunda parte de este estudio consiste en un análisis de seroprevalencia en la región central de la Península Ibérica utilizando muestras de leche en lugar de sangre.

III.2. Materiales y Métodos

III.2.1. Origen y obtención de las muestras

Se emplearon muestras de leche facilitadas por los Drs. Fernández-Garayzábal y Las Heras (Dpto. de Sanidad Animal, UCM). Los animales pertenecían a una gran cooperativa y estaban incluidos en una campaña para detección de mastitis subclínicas e inmunización con autovacunas a partir de las bacterias aisladas de cada explotación. Tanto ovejas como cabras eran de aptitud lechera y estaban clínicamente sanas en el momento de la toma de muestras.

Ovejas

Se obtuvieron muestras de leche de 250 ovejas pertenecientes a una cooperativa situada en la Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha en el periodo de tiempo

comprendido entre Octubre de 1998 y Octubre de 2002. Los animales utilizados en el estudio pertenecían a explotaciones intensivas o semi-intensivas (codificadas A-J). Las ovejas eran de raza Assaf, Manchega y cruce entre ambas. En el apartado IV.2.1 se describen las características de los animales de las explotaciones de forma detallada (distribución por razas, número de lactación, etc.). Previamente a la toma de muestras, se realizó un examen clínico tanto de la ubre como de la secreción mamaria con el objeto de detectar posibles signos de mastitis clínicas o de lesiones de tipo crónico. Se tomaron muestras de leche de cada mama (10 ml), tras desinfectar la punta del pezón con alcohol al 70% y previa eliminación de los primeros chorros de leche. Las muestras se conservaron a 4°C durante su transporte al laboratorio.

Para el estudio comparativo de PCR-ELISA en leche y sangre, se eligieron al azar muestras de 50 animales de una explotación de Guadalajara (explotación A) en el mes de abril de 2002. Las muestras de leche (tanto de mama izquierda, como de mama derecha) se obtuvieron según la metodología indicada más arriba, y las de sangre por punción en la vena yugular empleando tubos con heparina-litio.

Cabras

Para el estudio comparativo ELISA-PCR se emplearon 163 cabras, de la raza Murciano-Granadina, procedentes de 3 granjas distintas (I, K y L) situadas en la misma Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha, de las que se tomaron muestras de leche siguiendo el protocolo descrito para las ovejas. El estudio también se realizó entre octubre de 1998 y octubre de 2000. La explotación I era mixta de ovino y caprino y se tomaron muestras a las dos especies animales.

III.2.2. Cultivos celulares

III.2.2.1. Células y virus utilizados

Para la preparación de un control positivo para la PCR se extrajeron fibroblastos de ovejas seronegativas utilizando explantes de piel de la región inguinal. Los fibroblastos utilizados en este estudio procedieron de:

1. Fibroblastos cedidos por la Universidad de Zaragoza (Dras. Extramiana y Amorena).
2. Fibroblastos obtenidos de corderos sacrificados en el Matadero de Guadalix.
3. Fibroblastos obtenidos de corderos sacrificados en el Matadero de Villalba.

Para obtener los fibroblastos, se cortaba una muestra de piel inguinal en condiciones de esterilidad, y se realizaban tres lavados con PBS al que previamente se le había añadido antibióticos y fungicida (penicilina-estreptomicina, o gentamicina, y anfotericina B) al 1%. Se cortaban trozos de un centímetro cuadrado de piel, y se colocaban 4 ó 5 en una placa de Petri, cada una de ellos encima de 0,5 ml de suero fetal bovino (SFB, Gibco). Tras 24 horas de incubación a 37°C en atmósfera con el 5% de CO₂, se retiraba la piel y se añadía 4 ml de medio (RPMI-1640, Gibco) al que se había adicionando 10% de SFB y 1% de antibióticos.

La cepa de virus de MVV utilizada fue EV-1 (aislado por la Dra. Blacklaws, Universidad de Cambridge), cedido por la universidad de Zaragoza (Dras. Extramiana y Amorena).

Para comprobar la especificidad de las técnicas de PCR empleadas se utilizó el ADN de las líneas celulares MDBK (fibroblastos de riñón de bóvido, ATCC CCL-22), THP-1 (monocitos humanos, ATCC TIB-202), B6H (macrófagos de cerdo), U937 (monocitos humanos, ATCC CRL-2367), J774 (células macrofágicas de ratón, ATCC HB-197), fibroblastos primarios ovinos sin infectar, FL74 (linfocitos de gato infectados con el virus de la leucemia felina o FeLV), Ho6 (fibroblastos de gato infectados con el virus de la inmunodeficiencia felina o FIV), Cf2Th (fibroblastos de timo de perro fetal, ATCC CRL-1430) infectados con el virus de la inmunodeficiencia bovina o BIV, FLK-BLV (fibroblastos de riñón de cordero infectados con el virus de la leucemia bovina o BLV), y BLV-bat2 (fibroblastos de pulmón de murciélago infectados con BLV). La extracción de ADN se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado *III.2.3.1.1*.

III.2.2.2. Infección de fibroblastos ovinos con MVV

Tras lavar los cultivos primarios de fibroblastos ovinos con 10 ml de PBS se añadía 10ml de RPMI-1640 con SFB al 10% y 0,5 TCID₅₀/célula de EV-1 (aproximadamente 50 µl

del inóculo vírico en un frasco T75). Transcurridos 3 días se cambiaba el medio. A partir del cuarto día se empezaban a observar sincitios. Aproximadamente al séptimo día, cuando las células estaban altamente afectadas, se retiraba el medio y se lavaba con 10ml de PBS, desprendiendo las células con tripsina y procediendo a la extracción de ADN.

III.2.2.3. Obtención de virus a partir de células infectadas

Se siguió el mismo protocolo que para la infección, pero al añadir el virus, el medio utilizado fue con el 2% de SFB. El medio se cambiaba a las 24 horas y al tercer día post-infección. A partir del cuarto día se observaban diariamente las células para detectar sincitios, y el sobrenadante se recogía cuando las células estaban a punto de morir (aproximadamente al séptimo día) y se distribuía en varias alícuotas, que eran centrifugadas (Sorvall RD6000D) a 9000 rpm a 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se centrifugaba a 9000 rpm a 4°C durante otras 16-18 horas, resuspendiendo el sedimento en 1 ml de medio sin SFB.

III.2.3. Pruebas Laboratoriales

III.2.3.1. Diagnóstico por PCR

Para el diagnóstico por PCR empleamos dos técnicas distintas, “*LTR*” (Extramiana et al., 2002) y “*pol*” (Leroux et al., 1995).

III.2.3.1.1. Extracción fenólica del ADN de células de la leche y de sangre:

Se añadían 0,5 ml de PBS a 1 ml de leche en un Eppendorf, y tras centrifugar 10 minutos a 4000 rpm (microcentrífuga Eppendorf), se recortaba la nata de la superficie con un palillo estéril, eliminando el sobrenadante. El proceso se repetía tres veces. En las muestras de sangre, se procedía primero a lisar los eritrocitos mediante un buffer de lisis (10 mM KHCO₃, 460 mM NH₄Cl, 0,1 mM EDTA.2H₂O). Tras el lisado, las muestras se centrifugaron a 5.000 rpm durante cinco minutos, eliminándose el sobrenadante tras la centrifugación. El sedimento de linfocitos obtenido se lavó con PBS y se centrifugó a 10.000 rpm durante 3-5

minutos. La operación de lavado se repitió hasta obtener un sedimento limpio (mínimo tres lavados).

Para extraer el ADN se añadía 500µl de Buffer de Extracción de ADN (200mM Tris·HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS), y tras someter a vórtex vigoroso hasta resuspender el precipitado, se incubaba en hielo 10-15 minutos. A continuación, se centrifugaba 8 minutos a 4000 rpm, y se añadía 250 µl de fenol y 250 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, CIA) al sobrenadante. La extracción se conseguía centrifugando a 14.000 rpm 3 minutos. Se trasladaba la fase acuosa a otro tubo Eppendorf y se añadía 500 µl de CIA, repitiendo la centrifugación. Finalmente, el ADN se precipitaba con 500 µl de isopropanol frío y, tras centrifugar 2 minutos, se lavaba con etanol al 70%, resuspendiendo el sedimento una vez seco en 40 µl de agua bidestilada.

III.2.3.1.2. Amplificación por PCR-pol

Esta pareja de oligonucleótidos, propuesta por Leroux et al. (1995), amplifica un fragmento de 475 pares de bases (pb) en la región *pol* (Figura III.1), altamente conservada en los retrovirus, y que guarda un 78% de homología entre CAEV y MVV.

Oligonucleótidos empleados en dirección 5'-3':

- P1: DSAAGARAAATTARARGG, situado en la posición 2198 a 2215 en el virus MVV KV1772 (GenBank Accession Number S55323, Andresson et al., 1993).
- P2: ATCATCCATRTATATBCCAAATTG; situado en la posición 2650 a 2672 en MVV S55323.

(Donde B = C, G ó T; D = A, G ó T; R = A ó G; S = C ó G).

Reactivos de la reacción

La reacción fue llevada a un volumen final de 25 µl, utilizando 14 µl de agua bi-distilada, 2,5 µl de buffer 10x, 0,5 µl dNTPs (0,2mM; Biotools), 1 µl de Taq polimerasa (Biotools), 1,5 µl de los oligonucleótidos P1 y P2 (10 µM), y 4 µl del ADN extraído.

Condiciones de la reacción

Tras desnaturalizar a 95°C durante 10 minutos, las muestras se sometían a 35 ciclos de 1 minuto a 95°C (desnaturalización), 1 minuto a 45°C (hibridación) y 1 minuto a 72°C (extensión). Finalmente, se completaban las extensiones durante 10 minutos a 72°C. Todas las reacciones fueron realizadas en el termociclador PTC-100TM (Programmable Thermal Controller). Los productos amplificados se analizaban en un gel con el 1,5% de agarosa (Pronadisa), al que se había añadido bromuro de etidio.

III.2.3.1.3. Amplificación de secuencia de LTR (PCR-LTR)

Se siguió la técnica propuesta por Extramiana et al. (2002), que amplifica en la región U3R del *LTR* un fragmento de 291 pb en ADN circularizado (Figura III.1).

Oligonucleótidos empleados en dirección 5'-3':

- LTR2s: TGACACAGCAAATGTAACCGCAAG, situada en la posición 8989-9012 en el virus MVV KV1772 (GenBank Accession Number S55323).
- LTR2a: CCACGTTGGGCGCCAGCTGCGAGA, situada en la posición 153-176 en el mismo virus.

Reactivos de la reacción:

Al igual que la reacción anterior, se ajustó el volumen a 25 µl, utilizando los mismos reactivos, salvo los oligonucleótidos. Las cantidades añadidas de cada uno de ellos sólo variaron en el caso de la Taq polimerasa, de la que se añadió 2 µl, y en el caso del agua bi-distilada, de la que se añadió 13 µl.

Condiciones de la reacción:

Tras desnaturalizar el ADN 10 minutos a 95°C, se amplificaban las muestras en 50 ciclos de 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 70°C, y 90 segundos a 72°C. Se procedía, al igual que antes, a una extensión final a 72°C durante 10 minutos y a analizar los productos en geles de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio.

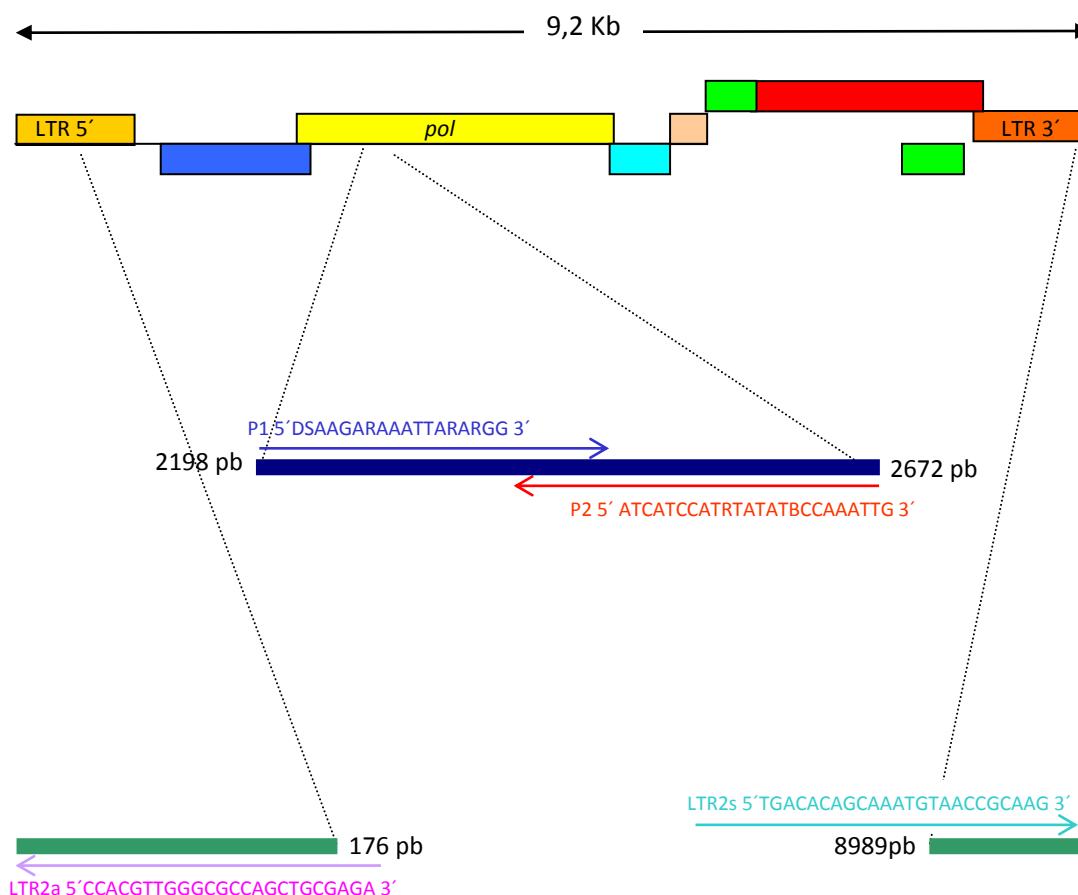


Figura III.1: Esquema de la amplificación empleando los oligonucleótidos P1-P2 (producto de amplificación mostrado en azul oscuro) (Leroux et al., 1995) y LTR2s y LTR2a (producto de amplificación mostrado en verde) (Extramiana et al., 2002). La situación dentro del genoma de MVV se refiere a la secuencia GenBank Accession Number S55323.

III.2.3.2. Diagnóstico por ELISA

Para el diagnóstico serológico se empleó el kit comercial Elitest (Hyphen Biomed, Francia, anteriormente Innotest MVV, Innogenetics). Esta técnica de ELISA fue desarrollada por un comité científico europeo (Saman et al., 1999; Varea et al., 2001). El suero de la leche, obtenido por centrifugación, o la leche directamente (los resultados fueron idénticos en ambos casos), se diluía a 1:10 en el tampón de dilución de muestras del kit; el suero sanguíneo, y los controles positivos y negativos suministrados se diluían 1:100 con el mismo tampón.

Se seguía el protocolo propuesto por el fabricante. Tras dispensar 80 µl del diluyente de las muestras en cada pocillo, se añadía 20 µl de la muestra diluida o del control, y la placa cubierta con una tira adhesiva era incubada 60 minutos a 37°C. Posteriormente tras lavar, se añadía a cada pocillo 100 µl de la solución de conjugado incubando 60 minutos a 37°C y tras lavar, 100 µl de la solución sustrato (TMB) que se incubaban 30 minutos a 20-25°C. Tras añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo, se leía a los 15 minutos a 450 nm (Tecan Spectra Fluor A-5082, Alemania). En cada placa se incluían los controles negativos y positivos suministrados con el kit y se calculaba el punto de corte siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.2.4. Estudio Estadístico

Para el análisis de los datos se emplearon los paquete estadísticos STATA (Versión 8.0 Stata Corp, College Station, Texas, USA) y WinEpiscope 2.0 (I. de Blas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza). Se calcularon los porcentajes de prevalencia de la infección, los coeficientes kappa y porcentajes de concordancia tanto para las comparaciones de PCR-ELISA, como para las comparaciones PCR-*pol*-PCR-*LTR*. Los títulos óptimos de corte para la técnica ELISA para las muestras individuales de leche en el estudio comparativo leche-sangre fueron determinados mediante el análisis *Receiver Operating Characteristic curve* (ROC), usando los resultados serológicos como “*gold standard*”. Además, se calcularon la sensibilidad y especificidad de las dos técnicas de PCR empleadas, comparando los resultados con los de ELISA, que se consideraron como verdaderos. La interpretación de los resultados de los coeficientes kappa sigue la interpretación publicada por Landis y Koch (1977): <0,2 concordancia muy débil; de 0,2 a 0,4 concordancia débil; de 0,4 a 0,6 concordancia moderada; de 0,6 a 0,8 buena concordancia; >0,8 concordancia casi perfecta.

Los animales positivos por la técnica de ELISA (con presencia de anticuerpos) fueron denominados **SRLVs-seropositivos** y se utilizó el término de **seroprevalencia** sólo para referirnos a la prevalencia hallada por la técnica de ELISA. Se uso el término **SRLVs-positivos** para animales que hubiesen dado positivo por las técnicas de ELISA y/o PCR, ya que al ser positivos por PCR no se podía emplear el prefijo “sero-“. La **prevalencia combinada** fue calculada a partir de animales que habían dado positivo por al menos una de las dos técnicas.

III.3. Resultados

III.3.1. Confirmación de la especificidad y sensibilidad de la PCR-*pol* y PCR-*LTR*

Las dos técnicas de PCR solo dieron resultado positivo en las muestras de fibroblastos ovinos infectados por el virus de Maedi Visna, siendo negativo para el resto de virus utilizados y con los controles negativos.

III.3.2. Estudio comparativo PCR-*pol*-ELISA en sangre y leche en ovejas

Se compararon los datos de PCR-*pol* y de ELISA tanto en leche como en sangre en 50 ovejas de la explotación A, para determinar la concordancia y el coeficiente kappa entre las pruebas (Tabla III.1). El punto de corte se calculó empleando la técnica ROC, que se emplea para comparar una técnica diagnóstica utilizada para analizar muestras del mismo individuo y que ajusta el punto de corte comparando los resultados de las muestras. El punto de corte calculado para las muestras positivas de leche aplicando la técnica ROC fue de 0,235. Al comparar la prueba ELISA en muestras de sangre y de leche se obtuvo un valor κ de 0,79 (buena concordancia), siendo el porcentaje de concordancia observada de 90% (90,6% en los animales seronegativos, y 88,9% en los animales seropositivos).

El 40% de las muestras de leche fueron positivas por PCR-*pol*, frente al 14% de las muestras de sangre. Al comparar la prueba de PCR-*pol* en sangre y leche, el valor κ fue bastante menor (0,30), indicando una concordancia débil (del 70%). Más reducido aún fue el valor de kappa al contrastar los resultados de PCR-*pol* y ELISA de sangre ($\kappa = 0,05$), y aunque fue ligeramente superior al comparar el ELISA de leche con la PCR-*pol* de leche, en cualquier caso siguió siendo muy débil ($\kappa = 0,20$) (Tabla III.1). La concordancia entre la prevalencia combinada en leche (SRLV L) y en sangre (SRLV S) fue buena ($\kappa=0,67$).

Tabla III.1: Porcentaje de concordancia y coeficientes kappa en el rebaño A (de ovejas) entre ELISA en muestras de sangre y leche, PCR-*pol* en sangre y leche y ELISA y PCR-*LTR* en sangre y leche. SRLV en sangre y leche, prevalencia mediante ELISA y/o PCR en sangre y en leche.

Prueba a comparar	Concordancia observada	κ	Error estándar	p
ELISA en sangre y leche	90%	0,79	0,14	<0,0001
PCR- <i>pol</i> en sangre y leche	70%	0,30	0,11	0,004
ELISA y PCR- <i>pol</i> en sangre	62%	0,05	0,12	0,342
ELISA y PCR- <i>pol</i> en leche	62%	0,20	0,14	0,08
SRLV en sangre y leche	84%	0,67	0,14	<0,0001

III.3.3. Comparación entre las dos técnicas de PCR y la de ELISA en la leche de ovejas

De las 194 ovejas utilizadas para el estudio, 127 fueron positivas por ELISA (65,5%). La técnica de PCR que amplificaba la región *pol* del genoma vírico detectó más animales positivos que la técnica de PCR que amplificaba la región *LTR*; concretamente de los 127 animales positivos a ELISA, 36 fueron detectados también con la técnica PCR-*pol*, y tan solo dos fueron detectados con la técnica PCR-*LTR*. Ambas técnicas presentaron una concordancia (factor kappa) muy baja al ser comparadas con la técnica de ELISA (0,024 y 0,020, respectivamente; Tabla III.2). Por otra parte, la comparación entre ambas técnicas de PCR entre sí dio un coeficiente kappa igualmente bajo (0,020), aunque la concordancia observada se incrementó hasta 73,2%. La sensibilidad de las técnicas de PCR fue baja (1,58% para la PCR-*LTR*, y 28,35% para la PCR-*pol*), obteniéndose mejores resultados para la especificidad (68,66% para la PCR-*pol* y 95,52% para la PCR-*LTR*) (Tabla III.2).

Tabla III.2: Comparación de las dos técnicas de PCR con ELISA en leche de ovejas.

	ELISA positivo	ELISA negativo	Sensibilidad	Especificidad	Conc. observada	Conc. esperada	κ
PCR- <i>pol</i> positivo	36 (63,16%)	21 (36,84%)	28,35%	68,66%	42,30%	43,60%	0,024
PCR- <i>pol</i> negativo	91 (66,42%)	46 (33,58%)					
PCR- <i>LTR</i> positivo	2 (40,00%)	3 (60,00%)	1,58%	95,52%	34,00%	35,30%	0,020
PCR- <i>LTR</i> negativo	125 (66,14%)	64 (36,86%)					

Conc.: concordancia

III.3.4. Comparación de dos técnicas de PCR y una de ELISA en leche de cabras

Los resultados de PCR y de ELISA con leche de cabras concordaron más entre sí que en el caso de las ovejas. No obstante, los coeficientes kappa fueron también muy bajos (Tabla III.3). La sensibilidad de ambas técnicas de PCR fue de 53,85% para la PCR-*pol* y de 7,69% para la PCR-*LTR* (Tabla III.3). La especificidad también fue superior que en la leche de ovejas: 73,33% y 99,33% respectivamente para cada una de las dos técnicas. Al comparar ambas técnicas de PCR entre ellas los resultados fueron bastantes similares a los de ovejas, con una concordancia observada de 73,39% y un valor kappa de 0,06.

Tabla III.3: Comparación de las dos técnicas de PCR con ELISA en leche de cabras.

	ELISA positivo	ELISA negativo	Sensibilidad	Especificidad	Conc. observada	Conc. esperada	κ
PCR- <i>pol</i> positivo	7 (14,89%)	40 (85,11%)	53,85%	73,33%	71,78%	67,79%	0,124
PCR- <i>pol</i> negativo	6 (5,17%)	110 (94,83%)					
PCR- <i>LTR</i> positivo	1 (50,00%)	1 (50,00%)	7,69%	99,33%	92,02%	90,99%	
PCR- <i>LTR</i> negativo	12 (7,45%)	149 (92,55%)					

Conc.: concordancia

III.3.5. Estudio de prevalencia en ovejas y cabras

Los resultados de seroprevalencia de SRLVs en leche se muestran en las Tablas III.4 y III.5. Se utilizaron datos de 250 ovejas de las cuales, 150 fueron positivas por ELISA en leche, dando una seroprevalencia del 60,0%. La seroprevalencia en cada rebaño osciló entre un 10% y un 94% y todos los rebaños fueron positivos (Tabla III.4). Además hubo un total de 81 animales que fueron positivos a la técnica de PCR-*pol* (32,4%). Al combinar los resultados de ambas pruebas diagnósticas, la prevalencia total se incrementó a un 72,2%.

Tabla III.4: Seroprevalencia, prevalencia por PCR-pol y prevalencia total en muestras de leche de ovejas.

Rebaño	Número de animales	Seroprevalencia	Prevalencia por PCR	Prevalencia Total PCR/ELISA	Incremento de la prevalencia por PCR
A	50	38,0%	40,0%	58,0%	20,0%
B	57	84,2%	3,5%	84,2%	0
C	25	68,0%	60,0%	80%	12,0%
D	10	10%	0,0%	10%	0
E	37	43,2%	37,8%	62,2%	19,0%
F	17	94,1%	0,0%	94,1%	0
G	13	92,3%	46,1%	100%	7,7%
H	24	50,0%	54,2%	75%	25,0%
I	14	42,9%	64,3%	71,4%	28,5%
J	4	75%	50,0%	75%	0
Total	250	60,0%	32,4%	72,2%	12,2%

De las 163 cabras incluidas en el estudio, 13 animales fueron seropositivos (8%) y 47 (28,8%) fueron positivos a PCR-pol (Tabla III.5). Los tres rebaños analizados fueron seropositivos y el porcentaje de animales positivos a ELISA en cada rebaño varió entre un 5,2% y un 57,1%. Al combinar los resultados de ambas pruebas el porcentaje de animales positivos a SRLVs fue de un 28,8%.

Tabla III.5: Seroprevalencia, prevalencia por PCR-pol y prevalencia total en muestras de leche de cabras.

Rebaño	Número de animales	Seroprevalencia	Prevalencia por PCR	Prevalencia Total PCR/ELISA	Incremento de la prevalencia por PCR
I	7	57,1%	71,4%	85,7%	28,6%
K	41	7,3%	12,2%	14,6%	7,3%
L	115	5,2%	32,2%	34,8%	29,6%
Total	163	8,0%	28,8%	28,8%	20,8%

III.4. Discusión

Los resultados presentados en este estudio concuerdan con lo publicado por otros autores sobre la utilización de muestras de leche para la técnica de ELISA. Mazzei y colaboradores (2005) compararon muestras de suero y leche de 140 ovejas procedentes de

cinco rebaños y obtuvieron un coeficiente de concordancia de 0,87. Por otro lado Brinkhof y colaboradores (2010) obtuvieron un coeficiente de concordancia de 0,98 en cabras y 0,95 en ovejas cuando compararon muestras de leche y sangre por ELISA. Los resultados presentados en esta tesis también muestran una buena correlación con respecto a la detección de anticuerpos por la técnica ELISA entre las muestras de sangre y leche, lo que viene a corroborar nuestra hipótesis inicial de que las muestras de leche pueden ser utilizadas para el diagnóstico de SRLVs en lugar de muestras de sangre. Las muestras de leche, por tanto, dan la misma información serológica que las muestras de sangre, con la ventaja de que son más sencillas de obtener.

La concordancia entre ELISA y PCR, tanto en sangre como en leche, fue baja, contrariamente a lo observado en estudios realizados en muestras de leche por Brinkhof y colaboradores (2010) que sí mostraban una buena concordancia. Sin embargo, concuerda con lo observado por otros autores en muestras de sangre (Brodie et al., 1992, de Andres et al., 2005).

La baja sensibilidad de las técnicas de PCR empleadas puede ser debida a distintos motivos. El más obvio es que los oligonucleótidos no hibriden correctamente con el ADN extraído. La PCR-*pol* fue diseñada para detectar SRLVs caprinos (Leroux et al., 1997a) que podría ser la causa de los bajos resultados con muestras ovinas. Sin embargo, la PCR-*LTR*, que había sido diseñada para SRLVs ovinos, dio resultados aún peores. Por otra parte, la alta mutabilidad de los SRLVs, establecida en 1 mutación por cada 10^5 nucleótidos (de Andres et al., 2005), apoyaría esta hipótesis y restaría eficacia a la técnica de PCR para la detección del ADN proviral. A este respecto, los oligonucleótidos propuestos por Leroux et al. (1997a) amplifican una secuencia en *pol* que se considera que está altamente conservada en retrovirus (Arjona et al., 2007).

Por otro lado, diversos investigadores han publicado la baja concordancia entre los resultados de ELISA y de PCR. En estudios realizados en el País Vasco se observó que mediante la técnica de PCR se podían detectar animales que no reaccionaban en el ELISA y viceversa (Juste et al., 2001). La detección de animales PCR positivos y ELISA negativos podría deberse a que la respuesta inmunitaria puede tardar meses o años en desarrollarse (de Andrés et al., 2005; Gonzalez et al., 2005), y los anticuerpos pueden producirse intermitentemente o puede haber reducción o pérdida de título de anticuerpos frente a SRLVs, por lo que no se detectarían por métodos serológicos, pero sí que habría presencia de

ADN proviral. Esto constituye uno de los mayores problemas a la hora de establecer un buen método de diagnóstico y de campañas de erradicación para SRLVs (de Andres et al., 2005).

En otros estudios se ha observado que los anticuerpos específicos podían desaparecer a los dos años post infección, incluso cuando se demostró mediante PCR la presencia de ADN proviral de MVV en los tejidos (Preziuso et al., 2003). Es posible que algunos de los animales positivos por PCR y negativos por ELISA en nuestro estudio (36,6% en el caso de ovejas y 85,1% en el de cabras) sean casos de falsos positivos; sin embargo, muchos de los mismos seroconvirtieron con el tiempo (como se expone en el Apartado V), por lo que la técnica de PCR resultó ser más precoz a la hora de detectar la infección.

Una posible explicación a los animales ELISA positivo y PCR negativo en leche sería que el animal podría haber desarrollado un cuadro clínico distinto del mamario (De la Concha-Bermejillo, 1997), albergando la infección en el tejido pulmonar, en el nervioso o en el articular, habiendo desarrollado anticuerpos circulantes detectables en leche, pero estando el virus restringido al lugar de infección. Otra posible explicación podría ser la capacidad mutagénica del virus, ya mencionada, lo que indicaría que la técnica de PCR es menos efectiva para la detección de ADN proviral (de Andres et al., 2005). En cualquier caso, como mencionamos anteriormente estas diferencias entre técnicas son similares a las descritas por otros autores (de Andres et al., 2005; Gonzalez et al., 2005; Reina et al., 2009).

En nuestro estudio encontramos que el porcentaje de animales positivos por PCR en leche fue mayor que en sangre, lo que coincidió con lo observado en el estudio de Brinkhof y colaboradores (2010), ya que ellos encontraron que la sensibilidad de la PCR era mayor en las muestras de leche. Es posible que estas discrepancias estén relacionadas con la carga vírica en cada fluido y que la sangre vehicule pocas células infectadas, a excepción de los momentos de viremia.

Una vez demostrado que los resultados por ELISA y por PCR-*pol* eran similares en leche y en sangre (Tabla III.1), el segundo objetivo fue realizar el primer estudio serológico en el área central de la Península Ibérica en ovejas y cabras, usando leche en lugar de sangre como muestras para la prueba ELISA. Además todas las muestras fueron a su vez analizadas usando la técnica de PCR-*pol*. Todos los rebaños de ovejas fueron positivos a SRLVs, y la seroprevalencia en ovejas fue de un 60%, lo que es superior que en otras regiones de España,

donde oscila entre un 12 y un 66% en animales y de un 30 a un 100% en rebaños (Luján et al., 2001). Nuestros resultados fueron similares a los presentados en León (66%) pero ligeramente superiores que los presentados en el País Vasco con un 52,4% (Juste et al., 1987) y Aragón, donde un 52,8% de los animales y un 100% de los rebaños era seropositivo (Perez et al., 2009). Las diferencias entre los resultados presentados en este estudio y otros realizados en otras regiones pueden estar relacionados con la raza, el sistema de producción y otros factores de riesgo relacionados con la infección. Algunos estudios han descrito que la infección por SRLVs estaba relacionada con el tamaño del rebaño, la edad de destete o los días de estabulación de las ovejas (Perez et al., 2009). Además, Leginagoikoa et al. (2009) relacionaron la incidencia de la infección con la duración de la estabulación, la densidad animal, la ventilación de los establos y la edad.

La seroprevalencia de SRLVs en cabras (8%) fue más baja que en ovejas (60%). Además fue más baja que en otros países europeos como Suiza (42%, Krieg y Peterhans, 1990) o Italia (81,5%, Gufler et al. 2008), pero similar a la descrita en otros países como Brasil (8%, Bandeira et al., 2009), Siria (12,5%, Giangaspero et al., 1992), o Sultanato de Omán (5,1%, Tageldin et al., 2012). Las diferencias de seroprevalencia en cabras y ovejas podrían estar relacionadas con la diferente susceptibilidad de especie a la infección, el manejo de las ovejas y las cabras, o con el virus en sí mismo. Por otro lado, no podemos excluir la posibilidad de una baja sensibilidad del test de ELISA en cabras, aunque otros autores han utilizado el mismo test de ELISA en cabras con resultados satisfactorios (Brinkhof et al., 2010). Nuestros resultados muestran que la seroprevalencia en la explotación I (57,1%) fue significativamente ($p < 0,002$) más alta que en las otras explotaciones de cabras; se dan las circunstancias de que esta explotación se componía de ovejas y cabras y que la seroprevalencia en ambas especies fue similar, por lo que no podemos descartar la posibilidad de una infección cruzada entre especies como ya ha sido mostrado en estudios anteriores (Brülisauer et al., 2005).

Se puede concluir que la leche constituye una buena muestra para el diagnóstico por ELISA, puesto que se obtienen resultados similares a cuando se emplea sangre. Sin embargo, la concordancia entre PCR y ELISA (tanto con muestras de leche como de sangre) fue baja, y ninguna de las dos técnicas por separado podría detectar a todos los animales infectados, por lo que sería necesario emplear ambos métodos para mejorar el diagnóstico. Usando de forma combinada las técnicas PCR y ELISA para el diagnóstico de SRLV en leche se detectó una prevalencia de SRLV de un 72,2% en ovejas y 28,8% en cabras (en vez de 60,0% y 8,0%,

respectivamente, cuando se empleó sólo ELISA). Otros autores han sugerido previamente que usando ambas técnicas de forma conjunta se incrementaría el porcentaje de animales positivos detectados y por tanto mejoraría la eficiencia de las campañas de control (Mazzei et al., 2005; Brinkhof et al., 2010). Algunos de los animales PCR positivo ELISA negativo podrían ser casos de falsos positivos, pero como se explica en el Apartado V sobre seguimiento, estos animales finalmente seroconvirtieron, por lo han sido considerados como verdaderos positivos.

*IV. Factores asociados a la infección por
Lentivirus de Pequeños Rumiantes*

IV.1. Introducción

En la actualidad está aumentando el número de estudios epidemiológicos que investigan factores de riesgo asociados a las infecciones por lentivirus de pequeños rumiantes (SRLVs). Esto probablemente está relacionado con el hecho de que la mejor forma de combatir estas infecciones es a través de su prevención, y para ello es necesario entender qué factores son los que favorecen la infección y la transmisión. El estudio que presentamos es el primer análisis epidemiológico en relación a SRLVs que se realiza en la región central de la Península Ibérica. Los estudios publicados hasta ahora relacionan seroprevalencia y factores de riesgo. Sin embargo, dado que, como se ha descrito en el Apartado III, al estimar seroprevalencia hay un porcentaje de animales infectados que no son tenidos en cuenta, en este Apartado se define “caso” como “resultado conjunto de las técnicas diagnósticas ELISA y PCR”. Además se explorará qué factores pueden afectar a la detección vírica de ADN en la leche, lo que puede estar relacionado con la leche como vehículo de transmisión.

Finalmente se investigará si la infección por SRLVs en ovejas y cabras puede afectar a la productividad. Como se expondrá, existe controversia entre la posible asociación entre infección y productividad. Algunos estudios relacionan la infección con pérdidas económicas por el sacrificio de animales positivos y con pérdidas en la producción, debido a la reducción de la producción láctea y a la reducción del peso al nacimiento (Blacklaws et al., 2012).

IV.2. Materiales y Métodos

IV.2.1. Animales

Se recogieron muestras de leche de 194 ovejas y 163 cabras, incluidas en un estudio de bacteriología realizado en el Departamento de Sanidad Animal. Las muestras fueron recogidas entre Octubre de 1998 y Octubre del 2000, de un total de 13 rebaños (10 de ovejas y 3 de cabras, apartado III.2.1.). Las granjas se encontraban localizadas en la región central de la Península Ibérica (provincias de Toledo, Guadalajara y Madrid). Las cabras eran de la raza Murciano-Granadina y eran mantenidas en régimen intensivo. De las nueve explotaciones de ovejas empleadas en

el estudio, cinco eran de la raza Manchega (36,6% de los animales) criadas en sistemas semi-intensivos, cuatro eran Assaf (51% de los animales) criadas en rebaños intensivos y uno era cruce de ambas (12,4%) criadas en sistema intensivo (Fig. IV.1.A). Las ovejas de la raza Assaf estaban localizadas principalmente en Madrid, las ovejas Manchegas en Toledo, Madrid y Guadalajara, el cruce F1 en Guadalajara y las cabras en Toledo. Las animales eran ordeñados mecánicamente (77,3% en el caso de las ovejas y 94,3% en las cabras) o manualmente (22,7% de las ovejas y 5,7% de las cabras) (Fig. IV.1.B). Los animales estaban entre su primera y novena lactaciones.

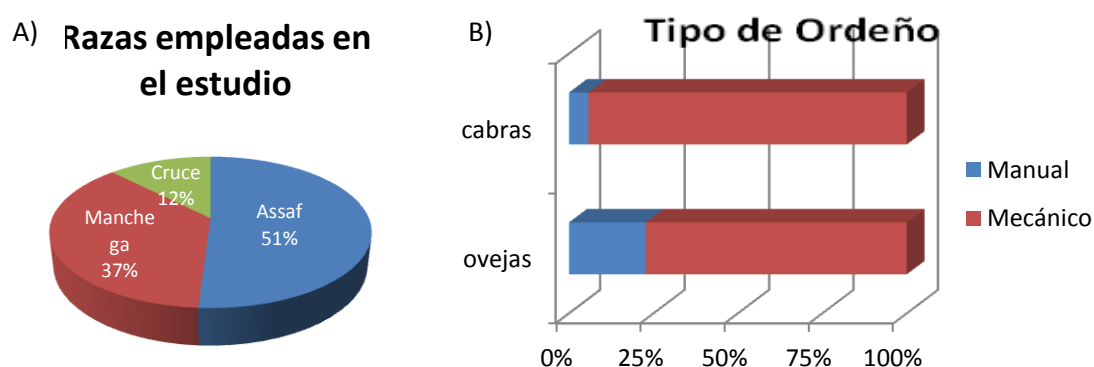


Figura IV.1: A) Distribución de las ovejas según las razas y B) Distribución de las ovejas y las cabras según el tipo de ordeño.

IV.2.2. Toma de muestras y diagnóstico de SRLVs

Las muestras de leche fueron recogidas asépticamente en tubos de 10 ml después de descartar el primer chorro (apartado III.2.1). Se realizó el Test de Mastitis California (CMT) en la propia explotación en el momento de la toma de muestra. Todas las muestras eran mantenidas a 4°C durante el transporte al laboratorio (Las Heras et al., 1999). Para el diagnóstico se utilizaron muestras de leche, cuya adecuación ha sido ya ratificada por varios autores (Mazzei et al., 2005; Brinkhof et al., 2010; Barquero et al., 2011). Las pruebas diagnósticas utilizadas fueron la técnica de ELISA (kit comercial Elitest, Hyphen Biomed, Francia), y la técnica de PCR-*pol* que amplifica la región *pol* (Leroux et al., 1995), previamente descritas en el apartado III.2.3.

IV.2.3. Definición de caso

El objetivo del estudio fue identificar factores de riesgo relacionados con la prevalencia de estas infecciones, y factores asociados a la presencia de ADN proviral en leche, lo que podría afectar a la transmisión de SRLV por esta secreción. Sin embargo, dado que se vio en el Apartado III que hay animales seronegativos pero PCR positivos, la estimación de seroprevalencia no incluiría a todos los animales infectados. Por ello, en este Apartado se define “caso” como “resultado conjunto de las técnicas diagnósticas ELISA y PCR”. Según esto, se consideran positivos a la infección por SRLVs (SRLV+) aquellos animales que dieron resultados positivos a la prueba de ELISA y/o PCR; y negativos (SRLV-), aquellos animales que dieron resultados negativos a ambas pruebas. El porcentaje de animales SRLV+ fue considerado como prevalencia, utilizando el término seroprevalencia para expresar el porcentaje de animales positivos por ELISA.

Por otra parte, los animales PCR positivos (PCR+) fueron considerados como animales “con presencia vírica” en la leche, y los animales PCR negativos (PCR-) fueron considerados como “sin presencia vírica” detectable.

IV.2.4. Variables examinadas

Las variables incluidas en el estudio se dividieron en tres categorías:

- variables relacionadas con la glándula mamaria y la presencia de mastitis,
- variables relacionadas con parámetros productivos y calidad de la leche, y
- variables relacionadas con la explotación ganadera y el sistema de producción.

No fue posible recabar información de todas las variables incluidas en el estudio para cada animal, porque, aunque la mayoría pertenecían a un estudio sobre mastitis bacteriana en la que se recogía un elevado número de datos, algunas muestras no correspondían a dicho estudio.

IV.2.4.1. Variables relacionadas con la glándula mamaria y la presencia de mastitis

Se recogió información de 118 ovejas y 126 cabras dependiendo de la variable analizada.

Presencia de mastitis, tipo de mastitis y presencia de lesiones: Aquellas ovejas en las que la mama era aparentemente normal y no había anormalidades morfológicas en la misma, pero en las que el análisis bacteriológico había sido positivo, fueron consideradas como que tenían “mastitis subclínica”. Los animales con algún tipo de anormalidad morfológica o con alteraciones en la leche fueron clasificados como que tenían “mastitis clínica”. Los animales en los que no se apreciaba anormalidad morfológica, la leche era normal y las muestras eran bacteriológicamente negativas fueron consideradas como “no mastitis”. Las lesiones morfológicas de la mama fueron clasificadas como induración, hipotrofia y nódulos.

Resultado en el CMT: se utiliza como método diagnóstico de mastitis, siendo un indicador del número de células inflamatorias presentes en la leche. Para el análisis estadístico se establecieron cuatro categorías, 0 (grupo de referencia), 1, 2, y 3, en las cuales los grumos estaban ausentes, poco evidentes, evidentes o muy evidentes, respectivamente (Las Heras et al., 1999).

Bacteriología: El análisis bacteriológico siempre se realizó sobre muestras frescas (2-4 horas). En el laboratorio, se extendieron 25 µl de muestra de leche en cada placa de agar con 5% de sangre (bio-Mérieux, Spain) y se incubaron a 37°C en aerobiosis durante 24 y 48 h. Se consideraron positivas aquellas muestras en las que se observaba >200 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml de un mismo tipo de colonia (González-Rodríguez et al., 1995). El resto de muestras se consideraron negativas. Después de la identificación preliminar de los grupos bacterianos (Quinn et al., 1994), se realizó la identificación bioquímica de la especie usando las galerías multisustrato (bio-Mérieux, España) adecuadas para cada aislado. En los casos en los que se consideró necesario analizar la presencia de micoplasmas en leche se siguió un procedimiento habitual de aislamiento e identificación empleando medios de enriquecimiento y placas de

medios específicos de micoplasmas en condiciones de microaerofilia, identificándose mediante la prueba de inhibición con digitonina (Quinn et al., 1994).

Vacunación: Los animales estaban incluidos en una campaña para la detección de mastitis subclínicas e inmunización con autovacunas a partir de los microorganismos aislados de cada explotación. Por tanto, el factor “vacunación” hace referencia a inmunización con esta autovacuna y los animales se encontraban dentro de dos grupos: “no vacunado”, que fue considerado el grupo de referencia, y “vacunado”.

IV.2.4.2. Variables relacionadas con parámetros productivos y calidad de la leche

Se recabó información sobre datos de parámetros productivos, lactación y la calidad de la leche de un total de 90 animales (62 ovejas y 28 cabras). Todas las variables fueron consideradas continuas a la hora de ser analizadas estadísticamente.

Numero de lactación y mes de lactación: Los animales muestreados se encontraban entre su primer y sexto mes de lactación. El número de lactación variaba de desde la primera lactación hasta la novena lactación. Las variables fueron consideradas continuas.

Producción láctea individual, número de días de lactación y número de corderos nacidos por parto: El número de corderos nacidos por animal gestante fue definido como una variable continua. La producción de leche era medida en litros por lactación y la duración de la lactación era medida en días.

Recuento de células somáticas, contenido de proteína, grasa, lactosa y extracto seco: Su estimación fue realizada en el Instituto Lactológico de Lecumberri (Navarra), usando azidiol como conservante. El análisis fue hecho en un aparato Combifoss, Fossomatic 250/360 (P.E./ALVO/03) y Milkoscan 255/605 (P.E./ALVO/02), certificado por ENAC, a 40°C 24-48 horas después de la toma de muestra. El recuento de células somáticas estima el grado de inflamación de la glándula mamaria. Para el análisis estadístico fue tratada como una variable

continua. Las variables referentes a la composición de la leche fueron consideradas continuas. En las cabras no se midió la concentración de lactosa.

IV.2.4.3. Variables relacionadas con la explotación ganadera y el sistema de producción

Se recabó información de las 194 ovejas y 163 cabras incluidas en el estudio. Para el análisis estadístico de las distintas variables se establecieron las categorías determinadas por la definición de cada una de ellas.

Provincia: Los animales procedían de tres provincias del área central de la Península Ibérica. Concretamente de Guadalajara (siendo esta el grupo de referencia), Madrid y Toledo.

Raza: Las ovejas incluidas en este estudio pertenecían a la raza Assaf (siendo este el grupo de referencia), Manchega, y cruce entre ambas (F1). En el caso de las cabras, la raza era Murciano-granadina.

Sistema de explotación: Las ovejas eran mantenidas en sistema de explotación semi-intensivo (Manchega) y sistema de explotación intensivo (Assaf y cruce F1). Las cabras eran explotadas en sistema intensivo.

Tipo de ordeño: El ordeño variaba en función de la explotación y era manual (grupo de referencia) o mecánico.

IV.2.5. Métodos estadísticos

Tanto el análisis univariable como multivariable fueron llevados a cabo usando el programa STATA (Versión 8.0, Stata Corp, College Station, Tejas, EE.UU.). El análisis univariable de todas las variables fue realizado para calcular la fuerza de su asociación con la infección por SRLVs. El análisis de las variables binarias y categóricas fue realizado usando los test chi-cuadrado o fisher. Las variables continuas fueron examinadas usándola t de Student. Las variables dependientes fueron también examinadas usando regresión logística univariable,

cuyos resultados se expresaron como *odds ratios* no ajustadas (OR) y su correspondiente 95% intervalo de confianza y valores de p.

Posteriormente se llevó a cabo el análisis de regresión logística binaria multivariante con la inclusión de variables independientes hacia delante para determinar la fuerza de la asociación entre la infección por SRLVs y los factores de riesgo, después de tener en cuenta los efectos de otras variables incluidas en los modelos de regresión. Las variables se mantuvieron en el modelo si estaban significativamente asociadas con la infección (Wald chi-test $p \leq 0,05$), o si la inclusión de la variable en el modelo mejoraba el ajuste del modelo (“likelihood ratio test” $p \leq 0,05$). Se investigó la interacción entre las variables en el modelo final mediante la inclusión de términos de interacción que se mantenían si mejoraban el ajuste del modelo (“likelihood estadístico” o “función de verosimilitud”, $p \leq 0,05$). El modelo final fue también examinado por el “goodness of fit” (bondad de ajuste) de los datos en predecir la variable dependiente usando la técnica de Hosmer-Lemeshow. Cualquier efecto relacionado con la agrupación de las observaciones dentro de la misma explotación fue medido mediante la inclusión de explotación como efecto aleatorio en el modelo final multivariable.

IV.3. Resultados

Se utilizaron para el análisis datos de 194 ovejas y 163 cabras procedentes de 13 explotaciones de la región central de la Península Ibérica de los cuales el 76,3% de las ovejas (148) y el 28,8% de las cabras (47) fueron positivos a SRLV.

IV.3.1. Relación entre la infección por SRLV y las variables relacionadas con la glándula mamaria y la presencia de mastitis

Los resultados del análisis estadístico para detectar la relación entre la infección por SRLV en ovejas y cabras y las variables relacionadas con mastitis

sugieren que no hubo una relación significativa entre la infección vírica y las variables relacionadas con mastitis. En la Tabla IV.1 se muestran los resultados del análisis en ovejas.

Tabla IV.1: Resultados de las variables relacionadas con mastitis en ovejas en los grupos SRLV positivo y SRLV negativo.

Variable	Categorías	Negativo a SRLV(%)	Positivo a SRLV(%)	OR ^a	95% CI ^b	p
CMT izquierda	0	19 (19,7%)	70 (80,3%)	Referencia		
	1	6 (25,6%)	27(74,4%)	0,71	0,29-1,76	0,464
	2	6 (21,7%)	10 (78,3%)	0,88	0,28-2,79	0,834
	3	3 (27,3%)	10 (72,7%)	0,65	0,15-2,79	0,567
CMT derecha	0	14 (21,4%)	54 (78,6%)	Referencia		
	1	11 (18,2%)	32 (81,8%)	1,22	0,44-3,39	0,701
	2	5 (37,5%)	18 (62,5%)	0,45	0,15-1,40	0,170
	3	3 (16,7%)	8 (83,3%)	1,36	0,27-6,72	0,708
Bacteriología Mama derecha	Negativo Positivo	23 (26,1%) 10 (16,7%)	65(73,9%) 50 (83,3%)	Referencia 1,77		
					0,77-4,05	0,177
Bacteriología Mama izquierda	Negativo	22 (26,3%)	74 (73,7%)	Referencia		
	Positivo	11 (20,6%)	43 (79,4%)	1,37	0,66-2,88	0,400
Mastitis derecha	Negativo	23 (27,1%)	65 (72,9%)	Referencia		
	Subclínica	10 (18,2%)	50 (81,8%)	1,67	0,72-3,85	0,229
Mastitis izquierda	Negativo	30 (28,0%)	77 (72,05)	Referencia		
	Subclínica	12 (20,0%)	48 (80,0%)	0,39	0,02-6,43	0,510
	Clínica	1 (50,0%)	1 (50,0%)	1,56	0,73-3,33	0,253
Presencia lesiones derecha	Negativo	11 (15,9%)	58 (84,1%)	Referencia		0,015
	Positivo	16 (36,4%)	28 (63,6%)	0,33	0,14-0,81	
Presencia lesiones izquierda	Negativo	22 (26,8%)	60 (73,2%)	Referencia		
	Positivo	5 (15,6%)	27 (84,4%)	1,98	0,68-5,78	0,212
Vacunada	No	4 (9,8%)	37(90,2%)	Referencia		
	Sí	7 (14,6%)	41(85,4%)	0,63	0,17-2,34	0,493

^aOdds Ratio. ^bIntervalo de confianza para el OR. ^cTomado como referencia.

IV.3.2. Relación entre la infección por SRLV y la productividad y calidad de la leche

Los resultados referentes a la productividad de ovejas y de cabras se resumen en la Tabla IV.2. Al analizar los resultados de los factores de producción no se observó ninguna relación estadísticamente significativa con la infección a SRLVs ni en ovejas ni en cabras. Sin embargo, todos los parámetros productivos en las ovejas estaban reducidos en el grupo positivo; en el caso de las cabras, el grupo positivo presentó disminuida la producción láctea y la duración de la lactación. En el caso de las ovejas del grupo positivo, la media de la producción láctea individual fue de 338,9 litros, mientras que la media en las del grupo negativo fue de 419,6 litros. La media del número de corderos por parto también estaba reducida en el grupo positivo (1,34 en el grupo positivo y 1,67 en el grupo negativo). Finalmente, el número de días que los animales estaban en lactación también estaba disminuido, 181,9 días el grupo positivo con respecto a 194,6 días el negativo (Tabla IV.2).

Tabla IV.2: Productividad en ovejas y en cabras en los grupos SRLV positivo y SRLV negativo.

Variable	SRLV	Media	Desviación Estándar	95% CI ^a	OR ^b	95% CI ^c	p
Ovejas							
Producción de leche (litros/lactación)	Negativo	419,56	94,94	346,57-492,54	Refer. ^d		
	Positivo	338,93	151,29	292,37-385,45	0,99	0,99-1,00	0,136
Número de corderos nacidos por parto	Negativo	1,67	0,50	1,28-2,05	Refer.		
	Positivo	1,34	0,59	1,16-1,52	0,38	0,11-1,36	0,138
Duración lactación en días	Negativo	194,56	31,04	170,70-218,41	Refer.		
	Positivo	181,87	47,63	167,20-196,52	0,99	0,97-1,01	0,450
Cabras							
Producción de leche (litros/lactación)	Negativo	667,62	248,91	534,99-800,26	Refer.		
	Positivo	623,17	205,60	492,54-753,80	0,99	0,99-1,00	0,606
Número de cabritos nacidos por parto	Negativo	1,81	0,40	1,60-2,27	Refer.		
	Positivo	1,92	0,29	1,17-2,10	2,53	0,23-28,0	0,447
Duración lactación en días	Negativo	264,56	28,47	249,39-279,74	Refer.		
	Positivo	250,83	50,87	218,51-283,16	0,99	0,97-1,01	0,362

^aIntervalo de confianza para la media. ^bOdds Ratio. ^cIntervalo de confianza para el OR. ^dTomado como referencia.

En el caso de las cabras, la producción láctea en el grupo positivo fue de 623,2 litros, comparado con 667,6 litros en el grupo negativo. La duración de la lactación en el grupo positivo fue de 250,8 días mientras que en el negativo fue de 264,6 días. El número de corderos, sin embargo, fue ligeramente superior en el grupo positivo a SRLV que en el grupo negativo (1,92 y 1,81 corderos/parto, respectivamente) (Tabla IV.2).

Los resultados referentes a la calidad de la leche se resumen en la Tabla IV.3. Ni en ovejas ni en cabras se apreció ninguna variación evidente en la composición de la leche entre animales positivos y negativos, ni ninguna relación estadísticamente significativa entre las variables relacionadas con la calidad de la leche y la infección.

Tabla IV.3: Composición de la leche en ovejas y en cabras en los grupos infectados por SRLVs y en los grupos control.

Variable	SRLV	Media	Desv.Est	95% CI ^a	OR ^b	95% CI ^c	p
Ovejas							
Recuento de células somáticas	Negativo	1081,6	2257,64	6,51- 2169,7	Refer. ^d		
	Positivo	1380,5	2057,52	980,42-1780,69	1,00	0,99- 1,00	0,566
Grasa	Negativo	8,56	1,85	7,67-9,45	Refer. ^d		
	Positivo	14,62	68,07	1,38-27,86	1,00	0,98-1,03	0,762
Extracto Seco	Negativo	10,27	0,43	10,06-10,48	Refer.		
	Positivo	10,20	1,27	9,96-10,46	0,95	0,60-1,45	0,829
Proteína	Negativo	4,76	0,67	4,44-5,08	Refer.		
	Positivo	4,98	0,71	4,84-5,12	1,73	0,75-4,02	0,201
Lactosa	Negativo	4,61	0,45	4,39-4,83	Refer.		
	Positivo	4,42	0,72	4,27-4,56	0,57	0,21-1,54	0,269
Cabras							
Recuento de células somáticas	Negativo	1622,8	1416,72	867,27- 2377,10	Refer,		
	Positivo	2327,7	1967,99	1077,34-3578,15	1,00	0,99-1,00	0,274
Grasa	Negativo	5,07	0,78	4,65-5,48	Refer,		
	Positivo	4,69	0,75	4,20-5,17	0,51	0,18-1,45	0,208
Extracto Seco	Negativo	14,32	0,95	13,82-14,83	Refer,		
	Positivo	13,90	0,92	13,31-14,49	0,85	0,51-1,40	0,516
Proteína	Negativo	3,84	0,42	3,61-4,06	Refer,		
	Positivo	3,62	0,32	3,42-3,83	0,20	0,02-1,99	0,173

^a Intervalo de confianza para la media. ^b Odds Ratio. ^c Intervalo de confianza para el OR. ^d Tomado como referencia.

IV.3.3. Relación entre la infección por SRLV y variables relacionadas con el tipo de explotación ganadera en ovejas

En el caso de las cabras, todas se encontraban explotadas en sistema intensivo, con ordeño mecánico (exceptuando un pequeño porcentaje con ordeño manual) y se encontraban en la provincia de Toledo. Por lo tanto, no se pudo realizar el análisis con los datos de las cabras y los resultados presentados en este apartado son procedentes de los datos de ovejas.

La mayoría de los resultados estadísticamente significativos estaban relacionados con las variables relacionadas con la explotación ganadera (Tabla IV.4). El mayor porcentaje de ovejas positivas se encontró en Madrid (81,75%), seguido de Toledo (73,91%) y de Guadalajara (62,22%). La raza con mayor porcentaje de infección de SRLVs fue la Assaf (86,87%), y el menor correspondió a la raza manchega (61,97%). El mayor porcentaje de animales positivos se localizó en explotación intensiva. Finalmente, el tipo de ordeño asociado a la infección por SRLVs en ovejas fue el mecánico, un 80,67%, con respecto al 61,36% de animales positivos en ordeño manual.

Tabla IV.4: Regresión logística univariable con respecto a las variables relacionadas con la explotación ganadera.

Variable	Categorías	Negativo a SRLV (%)	Positivo a SRLV (%)	OR ^a	95% CI ^b	p
Provincia	Guadalajara	17 (37,8%)	28 (62,2%)	Refer. ^c		
	Madrid	23 (18,3%)	103 (81,7%)	2,72	1,28-5,78	0,009
	Toledo	6 (26,12%)	17 (73,9%)	1,72	0,56-5,21	0,338
Raza	Assaf	13 (13,1%)	86 (86,9%)	Refer.		
	Cruce1	6 (25,0%)	18 (75,0%)	0,45	0,15-1,35	0,156
	Manchega	27 (38,0%)	44 (62,0%)	0,25	0,12-0,52	<0,001
Explotación	Semintensivo	27 (38,0%)	44 (62,0%)	Refer.		
	Intensivo	19 (15,4%)	104 (84,6%)	3,36	1,69-6,67	0,001
Tipo de ordeño	Manual	17 (38,6%)	27 (61,4%)	Refer.		
	Mecánico	29 (19,3%)	121 (80,7%)	2,63	1,27-5,45	0,009

^aOdds Ratio. ^bIntervalo de confianza para el OR. ^cTomado como referencia.

Como resultado del análisis multivariable se presentan dos diferentes modelos (Tabla IV.5). El primero es el modelo de regresión logística sin explotación como efecto aleatorio; el segundo es el modelo de regresión logística con explotación como efecto aleatorio, teniendo en cuenta la posible agregación de los datos debido a que animales de la misma explotación tienen condiciones de manejo similares. En ambos modelos de regresión logística, la infección por SRLVs se relacionó con la provincia donde se encontraba el animal, siendo cuatro veces mayor el riesgo de padecer la infección en Madrid y más de dos veces en Toledo, con respecto a Guadalajara. La variable *tipo de explotación* también estuvo relacionada con la infección. Al incluir la explotación como efecto aleatorio, se mantenía la relación estadísticamente significativa entre la infección y las variables tipo de explotación y localización, reduciéndose ligeramente el OR (Tabla IV.5).

Tabla IV.5: Análisis multivariable con y sin explotación como efecto aleatorio.

Variable	Categorías	Modelo sin efecto aleatorio			Modelo con explotación como efecto aleatorio		
		OR ^a	95% CI ^b	p	OR ^a	95% CI ^b	p
Provincia	Guadalajara	Refer. ^c			Refer.		
	Madrid	4,33	2,04-9,24	<0,001	4,26	1,06-17,08	0,041
	Toledo	2,55	0,83-7,80	0,1	1,90	0,28- 12,63	0,508
Explotación	Semintensivo	Refer.			Refer.		
	Intensivo	3,00	1,42-6,33	0,004	2,60	0,70- 9,72	0,012
				0,99*			0,04**

^aOdds Ratio. ^bIntervalo de confianza para el OR. ^cTomado como referencia. *Valor de p para la bondad de ajuste de Hosmer-Lemeshow. **Valor de p para el efecto aleatorio del nivel de explotación.

IV.3.4. Relación entre la detección vírica en leche por PCR y variables relacionadas con mastitis

En el caso de las ovejas, la detección de ADN proviral en leche estaba relacionada con el mes de lactación (siendo más avanzado en las ovejas PCR+ que en las PCR-) y, aunque no fue significativo, también se observó el aumento de células somáticas en la leche de las ovejas positivas por PCR (Tabla IV.6). Es interesante, a su vez, que el número de células somáticas estuvo más aumentado en la mama derecha de las ovejas positivas a SRLV, lo que probablemente condicionara el hecho

de que hubiera más resultados de PCR positivos en mama derecha (resultados no mostrados). En el caso de las cabras, no hubo ninguna asociación estadísticamente significativa entre los parámetros de lactación y el diagnóstico por PCR del animal.

Tabla IV.6: Análisis univariable de regresión logística y medias de las variables de mes y número de lactación y de recuento de células somáticas en mama derecha (Drcha) e izquierda (Izda) en ovejas y cabras.

Variable	PCR	Media	Desviación estándar	95% CI ^a	OR ^b	95% CI ^c	p
Ovejas							
Mes de lactación	Negativo	2,14	1,08	1,87-2,42	Refer. ^d		
	Positivo	3,71	2,13	1,74-5,69	1,81	1,16-2,82	0,008
Número de lactación	Negativo	3,46	1,62	3,04-3,89	Refer.		
	Positivo	2,00	0	2,00-2,00	0,27	0,05-1,45	0,129
Recuento Células Somáticas Drcha	Negativo	1379,27	2036,63	833,85-1924,68	Refer.		
	Positivo	1625,50	3619,30	2182,73-5413,73	1,00	0,99-1,00	0,801
Recuento Células Somáticas Izda	Negativo	1250,25	2016,09	705,22-1795,28	Refer.		
	Positivo	1405,5	1737,09	417,99-3228,99	1,00	0,99-1,00	0,854
Cabras							
Mes de lactación	Negativo	3,10	2,72	2,50-3,70	Refer.		
	Positivo	3,20	2,70	2,47-3,93	1,01	0,89-1,15	0,830
Número de lactación	Negativo	3,47	1,67	3,04-3,89	Refer.		
	Positivo	3,43	1,58	3,00-3,87	1,03	0,78-1,27	0,979
Recuento Células Somáticas	Negativo	1622,19	1416,73	867,27- 2377,11	Refer.		
	Positivo	2327,75	1967,99	1077,34-3578,16	1,00	0,99-1,00	0,274

^aIntervalo de confianza para la media. ^bOdds Ratio. ^cIntervalo de confianza para el OR. ^dTomado como referencia.

En cabras se dispuso de datos de número de células somáticas de ambas mamas combinadas. Al igual que en las ovejas, se observó un aumento del recuento de células somáticas en los animales positivos por PCR, pero éste no fue significativo (Tabla IV.6). Sin embargo, sí se detectó una relación significativa entre el aumento de

valores de CMT y los valores positivos de PCR, tanto en mama derecha como en mama izquierda (Tabla IV.7).

Tabla IV.7: Análisis univariable entre la detección vírica en leche por PCR y los valores de CMT en ovejas y cabras.

Variable	Categorías	Negativo por PCR(%)	Positivo por PCR(%)	OR ^a	95% CI ^b	p
Ovejas						
CMT derecha	0	52 (73,2%)	19 (26,8%)	Refer. ^c		
	1	33 (76,7%)	10 (23,3%)	0,83	0,34-2,00	0,677
	2	14 (60,9%)	9 (39,13%)	0,76	0,65-4,73	0,263
	3	5 (45,5%)	6 (54,6%)	3,28	0,89-12,02	0,073
CMT izquierda	0	63 (70,8%)	26 (29,2%)	Refer.		
	1	28 (84,8%)	5 (15,2%)	0,43	0,15-1,24	0,120
	2	12 (75,0%)	4 (25,0%)	0,81	0,24-2,74	0,732
	3	5 (41,7%)	7 (58,3%)	3,39	0,99-11,67	0,053
Cabras						
CMT derecha	0	30 (73,2%)	11 (26,8%)	Refer.		
	1	41 (77,4%)	12 (22,6%)	0,79	0,31-2,05	0,640
	2	15 (83,3%)	3 (16,7%)	0,55	0,13-2,25	0,403
	3	3 (21,4%)	11 (78,6%)	10	2,34-42,69	0,002
CMT izquierda	0	32 (76,2%)	10 (23,8%)	Refer.		
	1	36 (75,0%)	12 (25,0%)	1,07	0,41-2,79	0,896
	2	11 (73,3%)	4 (26,7%)	1,16	0,30-4,47	0,825
	3	1 (11,1%)	8 (88,9%)	25,6	2,85-230,3	0,004

^aOdds Ratio. ^bIntervalo de confianza para el OR. ^cTomado como referencia.

IV.4. Discusión

El impacto en la productividad causado por la infección por SRLVs es controvertido, ya que algunos estudios muestran una reducción de la productividad (Dohoo et al., 1987; Pekelder et al., 1994) mientras que en otros no se observa ninguna variación (Legrottaglie et al., 1999; Dungu et al., 2000; Kaba et al., 2012). Otros estudios no han encontrado ninguna asociación entre el número de corderos nacidos y la infección por SRLVs (Dungu et al., 2000; Arsenault et al., 2003).

Estudios realizados en Italia en cabras no mostraron ninguna variación significativa ni en la producción láctea ni en la calidad de la leche (Turin et al., 2005), lo que concuerda con lo observado por Nord et al. (1997) en Noruega. Sin embargo, Kaba et al. (2012) sí que encontraron que en cabras la calidad de la leche se reducía, pero no así la producción láctea, al contrario que Leitner et al. (2010), quienes sí detectaron una reducción significativa en la producción láctea de cabras infectadas por SRLVs en su primera lactación pero no en las lactaciones posteriores. En el estudio presentado en esta tesis los datos de productividad y calidad de la leche no mostraban una diferencia significativa entre animales infectados por SRLVs y animales negativos, lo que estaría en concordancia con lo observado por otros autores (Legrottaglie et al., 1999). Sin embargo, todos los parámetros productivos medidos en las ovejas estuvieron reducidos en el grupo infectado, y en las cabras ocurría lo mismo para la producción de leche, aunque el número de corderos no se reducía. Es posible que el tamaño de la muestra utilizada no fuera suficientemente grande como para medir estas diferencias. Puesto que se observó reducción en dos rebaños diferentes de dos especies distintas, parece claro que aunque no sea significativa, la tendencia general de la infección es reducir la productividad. No obstante, se necesitan estudios con mayor número de animales para poder medir adecuadamente estas diferencias. En cualquier caso, una reducción de la producción láctea de aproximadamente 80 litros/oveja y 44 litros/cabra implica importantes pérdidas económicas para la explotación ganadera.

Algunos estudios sugieren susceptibilidad de la raza de ovejas a la infección por MVV (Dawson and Wilesmith, 1985; Cutlip et al., 1986; Snowden et al., 1990), mientras que otros no encuentran asociación entre ambos factores (Smith, 1992). En el estudio que presentamos, cada raza ovina fue mantenida en un sistema de producción diferente, por lo que no fue posible determinar cuánto de la prevalencia de MVV está relacionado con la raza y cuánto con el sistema de producción. Los resultados mostraron que la prevalencia del cruce F1 criado en intensivo (75,0%) era más baja que la prevalencia de MVV para Assaf criada en intensivo (86,9%). Por otro lado, la prevalencia de la raza Manchega criada en semi-intensivo en nuestro estudio (62,0%) era más alta que la seroprevalencia publicada por otros autores en raza Latxa (25%) en semi-intensivo (Leginagoikoa et al., 2006). Por tanto, aunque no se pueda

medir, la raza sí parece tener cierto efecto en la susceptibilidad de los animales por la infección.

Otros estudios muestran una clara asociación entre la seroprevalencia de MVV y el régimen de explotación, observándose que la seroprevalencia es mayor en el régimen intensivo que en el semi-intensivo y a su vez que en el extensivo (Leginagoikoa et al., 2006). En otro estudio realizado por Pérez et al. (2009) también se observa una aparente relación entre la prevalencia de MVV y el sistema de explotación, al comparar sus datos con otros estudios realizados anteriormente. En nuestro estudio, la prevalencia de Maedi Visna en el régimen de explotación semi-intensiva fue de 62%, bastante similar al 52,83% encontrado el mismo régimen de explotación en Aragón (Pérez et al., 2009) y bastante mayor al 25% observado en el País Vasco por Leginagoikoa et al. (2006) en el mismo régimen de explotación. Por otro lado la prevalencia encontrada en el régimen de explotación intensivo (84,6%) concuerda con el 77% descrito por Leginagoikoa et al. (2006). Factores como el número de animales infectados que había en el rebaño inicialmente, la densidad animal y la posibilidad de reinfecciones podrían explicar estos resultados. También la cepa vírica, diferencias en la susceptibilidad de la raza y el sistema de producción podrían contribuir a la infección por MVV. Probablemente la raza está relacionada con la resistencia animal a la infección y el sistema de producción está relacionado con la transmisión. Por lo tanto, son necesarios más estudios con mayor número de animales en los que se puedan separar estas dos variables y estudiarlas de forma independiente.

La infección por SRLVs no estuvo relacionada con la infección bacteriana ni en ovejas ni en cabras, lo que concuerda con lo observado por Sánchez et al. (2001) en infecciones por CAEV. Estos autores encontraron un aumento significativo del número de células somáticas en leche en animales seropositivos, contrariamente al estudio realizado en Polonia por Kaba et al. (2012) y en Israel por Leitner et al. (2010), quienes no encontraron relación entre resultados seropositivos a CAEV y el recuento de células somáticas. En el estudio presentado en este Apartado no se observó un aumento estadísticamente significativo de las células somáticas, pero en el estudio de seguimiento que se presenta en el Apartado V, sí se observó un aumento significativo de este parámetro, relacionado sobretodo con la detección vírica en leche. Aunque el recuento de células somáticas no fue significativo, sí lo fue el CMT

en las cabras. En las ovejas estuvo cercano a ser significativo, especialmente cuando se compararon los resultados sólo con el resultado de PCR, en lugar de con el de PCR y/o ELISA (SRLV). Es interesante reflexionar sobre el distinto papel que juegan los anticuerpos en ovejas y en cabras y sobre el que se discute en el Apartado V: en cabras la detección vírica por PCR se mantenía, aunque se detectaran anticuerpos por ELISA; sin embargo, en ovejas la presencia de anticuerpos parecía afectar al número de células inflamatorias y reducir la detección vírica por PCR. Este efecto será a su vez descrito posteriormente en el Apartado V, pero los resultados presentados aquí refuerzan nuestra teoría de la capacidad neutralizante de los anticuerpos en ovejas pero no en cabras. La relación entre valores de positivos por PCR y el aumento de células inflamatorias en leche es esperable, y es relevante sobre todo porque la presencia vírica en leche podría estar relacionada directamente con la transmisión por vía lactogénica. Por tanto, aquellas medidas que indirectamente reduzcan la inflamación de la mama, podrían a su vez reducir la tasa de transmisión al haber menos células que vehiculen el ADN proviral.

A pesar de que la infección por SRLV se asocia con mastitis de tipo indurativo en los animales (Dawson, 1987; Snowden et al., 1990), no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa entre el tipo de lesión mamaria y la infección por SRLV. Esto podría estar relacionado con el hecho de que la mayoría de los animales no estaban afectados por mastitis, o presentaban mastitis subclínica. No había evidencia de otro tipo de proceso en los animales estudiados, pero no se puede excluir que estos animales estuvieran desarrollando otro cuadro clínico de la enfermedad (nervioso, respiratorio o articular) en lugar de la forma mamaria de la enfermedad.

Los resultados del análisis de regresión logística presentados en este estudio apuntan que existe una clara asociación entre la infección por SRLVs y la localización geográfica y la raza-régimen de explotación empleado. Sin embargo, otras variables con una aparente asociación con la infección, como es el tipo de ordeño, dejaron de ser significativas una vez incluidas en el modelo multivariable. Es interesante recalcar aquí que en resultados preliminares de regresión lineal (datos no mostrados), es la variable geográfica la que desaparece del modelo, persistiendo el tipo de ordeño. Probablemente esto indique que estas variables están altamente relacionadas, y

posiblemente a su vez estén relacionadas con otras variables que no hayan sido incluidas en el estudio. La asociación geográfica con la infección por SRLVs no había sido descrita anteriormente, aunque se había observado diferencias entre países y regiones. En España se ha publicado que 12%-66% de los animales 30%-100% de los rebaños están infectados por MVV (Luján et al., 2001; Berriatua et al., 2003; Pérez et al., 2009). Es posible que en nuestro país las diferencias geográficas sean en parte debidas a que los animales se mantienen en distintos sistemas de explotación en las diferentes regiones (en el norte de España, País Vasco, Aragón, o Navarra las explotaciones suelen ser intensivas o semi-intensivas). Otros autores han encontrado evidencia de variación geográfica en Inglaterra (Dawson and Wilesmith, 1985).

A pesar de que el tipo de ordeño pasó a ser no significativo, sí que pareció tener algún efecto, puesto que como hemos comentado al analizar los resultados por regresión lineal (datos no mostrados), el efecto geográfico desaparecía y cobraba importancia el tipo de ordeño. Indudablemente, al ser pocos rebaños los resultados de regresión lineal son muy preliminares y por ello hemos presentado únicamente los resultados de regresión logística. Algunos autores han puesto de manifiesto que la introducción de ordeño mecánico en vacas parece favorecer la emergencia de patógenos que no estaban presentes cuando el ordeño era manual (Zecconi et al., 2000). Este estudio describía una relación entre la inmunidad local en el pezón, el proceso de ordeño mecánico y el porcentaje de infecciones en la glándula mamaria. En el caso de MVV, la aparente relación entre el ordeño y la infección por SRLVs podría deberse a la transmisión aerógena en la línea de ordeño, pero también podría estar relacionado con la transmisión a través de la ordeñadora. Por otro lado, el estudio realizado por Adams et al. (1983) demostraba que la desinfección de las máquinas tras el ordeño de animales infectados evitaba la transmisión a animales libres de infección. Puesto que no hay estudios epidemiológicos que exploren la relación con el ordeño manual, pues muchas de las explotaciones utilizan el mecánico, sería interesante realizar estudios con mayor número de animales y controlando otros factores para determinar si existe realmente una relación entre el tipo de ordeño y la prevalencia de SRLVs. Sobre todo, es importante conocer esta posible asociación a la hora de establecer mejores medidas preventivas y de control de la infección.

*V. Estudio del seguimiento en el tiempo
de la infección por Lentivirus de Pequeños
Rumiantes*

V. 1. Introducción

Tradicionalmente el diagnóstico de las infecciones por SRLVs se basa en técnicas serológicas y, aunque no existe una técnica “*gold standard*”, la OIE en su edición de 2008 recomienda el método ELISA y la Inmunodifusión en Gel de Agar. Para interpretar las técnicas serológicas es necesario conocer algunos detalles sobre la respuesta inmunitaria frente a SRLVs en ovejas y en cabras. La infección por SRLV induce anticuerpos frente a todas las proteínas virales pero son los anticuerpos frente a las envoltura vírica los funcionalmente interesantes, ya que bloquean el reconocimiento de gp135SU por el receptor, neutralizando al virus. El método de detección de los anticuerpos anti-SRLV condiciona qué proteínas virales se detectan: ELISA y western blot evidencian proteínas Gag, mientras que la inmunoprecipitación favorece la detección de proteínas Env (Blacklaws, 2012).

Parece claro que los anticuerpos neutralizantes se inducen lentamente, son de escasa afinidad y de título relativamente bajo. Pero se duda de que sean funcionalmente importantes *in vivo*, ya que los SRLVs son virus asociados a células y pueden diseminarse por contacto célula-célula, ya que inducen sincitios, habiendo así pocos virus que neutralizar y su neutralización puede no afectar a la propagación y diseminación vírica (revisado en Bertoni y Blacklaws, 2010). Esta circunstancia coincide con el resto de los lentivirus, a excepción del virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), uno de los pocos lentivirus en los que los anticuerpos neutralizantes tienen relevancia y son protectores frente a la infección (Leroux et al., 1997b). Es especialmente preocupante el hecho de que los anticuerpos no sólo no protejan, sino que también favorezcan la infección, ya que los macrófagos y las células dendríticas, las células diana por excelencia de los SRLVs, poseen receptores para la fracción Fc de las inmunoglobulinas, lo que propicia la internalización de los complejos virión-anticuerpo (revisado en Blacklaws, 2012). Esto incrementa la eficiencia de la infección en las células con receptores Fc y el tropismo de los virus por estos tipos celulares. Se ha observado que los anticuerpos neutralizantes retrasan más que inhiben la replicación en los macrófagos, cuando se compara con la cinética en los fibroblastos (Kennedy-Stoskopf y Narayan, 1986; Jolly y Narayan, 1989; Jolly et al., 1989).

Además de anticuerpos de la clase IgM, tras la infección natural por SRLV se inducen anticuerpos IgG, pero en las ovejas sólo se detectan anticuerpos IgG1 anti-MVV (Bird et al., 1995), mientras que en las cabras infectadas por CAEV puede haber anticuerpos IgG1 o IgG2 (Trujillo et al., 2004). El desarrollo de anticuerpos IgG1 sugiere una respuesta Th2 (dominada

por IL-4), mientras que la presencia de IgG2 es indicativa de una respuesta Th1 (dominada por IFN-gamma y por la inducción de anticuerpos que median la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o ADCC). De hecho, tras la infección natural en las ovejas no se detectan anticuerpos frente a Env que medien ADCC (Singh et al., 2006). Se ha observado que las cabras con respuesta preferentemente Th2, ligada a una gran presencia de IgG1 frente a CAEV, desarrollan artritis, mientras que los que poseen una respuesta mixta IgG1/IgG2 permanecen sin signos clínicos, sugiriendo que los anticuerpos IgG2 anti-SRLV protegen frente al desarrollo de patología (Trujillo et al., 2004), lo que puede estar ligado a su función efectora. En cualquier caso, es la presencia de antígeno viral en los tejidos, y la respuesta inmune frente al mismo, lo que precipita el desarrollo de signos clínicos (Singh et al., 2006).

En resumen, los anticuerpos frente a los SRLVs son tardíos y sus funciones neutralizantes no siempre se consideran beneficiosas. Por otra parte, la respuesta inmunológica humoral es diferente en las ovejas y en las cabras.

En el Apartado III y en varios estudios se ha demostrado que la combinación de ELISA y PCR puede incrementar la detección de estas infecciones, pues parece que la técnica de PCR es más precoz en la detección que la técnica de ELISA (Brinkhof et al., 2010, Barquero et al., 2011). Sin embargo, las grandes discrepancias observadas entre estas técnicas diagnósticas podrían deberse a alguna otra razón además de la precocidad a la hora de detectar la infección. El objetivo del presente estudio fue el análisis de la evolución de ambas técnicas diagnósticas durante seis meses en leche de ovejas y cabras infectadas, a fin de intentar identificar el origen de estas discrepancias y con qué factores se encuentran relacionadas. Para ello se exploró la asociación entre la infección y factores relacionados con la presencia de mastitis.

V.2. Materiales y Métodos

V.2.1. Animales y muestras

En este estudio se analizó la presencia de anticuerpos y de ADN proviral en muestras de leche. Se muestrearon 28 ovejas y 31 cabras de dos granjas diferentes pertenecientes a la misma cooperativa mencionada anteriormente (apartado III.2.1). Las ovejas pertenecían a la explotación C y eran de la raza Assaf; las cabras pertenecían a la explotación L y eran de la

raza Murciano-Granadina; estaban explotadas en sistemas intensivos y el ordeño era mecánico. Las muestras de ovejas fueron tomadas aproximadamente cada 30 días, entre Diciembre de 1998 y Junio de 1999. En el caso de las cabras, se produjo un brote de agalaxia durante el periodo de estudio, por lo que sólo se recogieron 3 o 4 muestras por animal durante el periodo de estudio entre Marzo y Septiembre de 1999. Previo a la toma de muestras se procedió a examinar la glándula mamaria de cada animal para comprobar la presencia de mastitis clínica. De igual forma, se anotaron las características del animal en cuanto a número de lactación, mes de lactación y estatus vacunal. Se tomaron muestras de leche de cada mama (10 ml) en contenedores estériles, tras desinfectar la punta del pezón con alcohol al 70% y previa eliminación de los primeros chorros de leche. Las muestras se conservaron a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio. Como prueba complementaria se analizó el recuento de células somáticas (apartado IV.2.4.2) y análisis bacteriológico (apartado IV.2.4.1.). La definición de mastitis subclínica se detalla en el apartado IV.2.4.1.

V.2.2. Diagnóstico de SRLVs

Para el diagnóstico se utilizaron muestras de leche, cuya utilización ha sido ya descrita por varios autores (Mazzei et al., 2005; Brinkhof et al., 2010; Barquero et al., 2011).

Las técnicas diagnósticas utilizadas fueron la técnica de ELISA descrita en el apartado III.2.3.2 y la técnica de PCR-*pol* descrita en el apartado III.2.3.1.2 y que amplifica la región genómica *pol* (Leroux et al., 1995).

V.2.3. Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el programa Stata software (Versión 8.0 Stata Corp, College Station, Texas, USA). Las comparaciones entre los porcentajes de ELISA y PCR mes a mes se realizaron utilizando tablas de contingencia y usando los test chi-cuadrado o Fisher test. Para el análisis de factores asociados a la infección se utilizó la técnica de regresión logística con individuo como efecto aleatorio. Las variables dependientes estudiadas fueron el *recuento de células somáticas*, la *presencia de mastitis*, el *número de lactación*, el *mes de lactación*, el *estar o no vacunadas*, y la *presencia de infección bacteriana*. Estas variables fueron definidas en el apartado IV.2.4 y se seguirá la

misma clasificación. Se exploró su relación con la presencia de anticuerpos y con un resultado positivo a la técnica de PCR. Se consideraron los resultados estadísticamente significativos cuando el valor $p \leq 0,05$.

V.3. Resultados

V.3.1. Evolución de la infección en ovejas

Inicialmente se analizó la presencia de anticuerpos en la mama derecha e izquierda de diez ovejas. Los resultados fueron similares en ambas mamas, por lo que se combinó la leche de ambas para realizar la prueba de ELISA. En el caso de la PCR, los resultados por cada mama fueron diferentes, por lo que se realizó la prueba en la leche de cada ubre de forma independiente. Los resultados por mes se muestran en la Tabla V.1 y Figura V.1. La presencia de anticuerpos y la de ADN proviral no evolucionaron de forma paralela durante los seis meses que duró el estudio, ya que el porcentaje de animales positivos a ELISA aumentó progresivamente. Sin embargo, la presencia de ADN proviral aumentó hasta Abril y disminuyó marcadamente en Junio (Tabla V.1). Además, la presencia vírica no fue bilateral habiendo más animales positivos por PCR en la mama derecha que en la mama izquierda (Tabla V.1).

Tabla V.1: Evolución de la prevalencia mensual de ovejas positivas a SRLV por ELISA y PCR. Prevalencia global: porcentaje de animales ELISA y/o PCR positivos. ELISA+, resultado positivo a la prueba de ELISA. PCR+, resultado positivo a la prueba de la PCR.

Mes	Número de ovejas	Prevalencia ELISA+	Prevalencia	Prevalencia	Prevalencia PCR+ global	Prevalencia global
			PCR+ Mama izquierda	PCR+ Mama derecha		
Diciembre	25	28,00%	0%	8,00%	8,00%	32,00%
Enero	27	29,63%	0%	7,41%	7,41%	33,33%
Febrero	27	29,63%	14,81%	14,81%	14,81%	40,74%
Marzo	25	44,00%	8,00%	25,00%	25,00%	60,00%
Abril	24	54,17%	25,00%	25,00%	37,50%	62,50%
Junio	21	52,38%	9,52%	9,52%	9,52%	52,38%

Estas diferencias en el porcentaje de animales seropositivos con respecto al mes fue estadísticamente significativa ($p < 0,017$), no siendo así en el caso de la PCR, tanto en mama derecha como mama izquierda.

La evolución en el tiempo tanto de los anticuerpos como del ADN proviral presentó varios patrones comunes, de forma que los animales se clasificaron en 7 grupos diferentes (Tabla V.2). Aproximadamente un tercio de las ovejas (32,1%) nunca fue positiva ni por ELISA ni por PCR durante el periodo de estudio y fueron considerados negativas (grupo 1). Cuatro ovejas (14,28%) fueron ELISA positivo constantemente desde la primera muestra y nunca se detectó ADN proviral (grupo 2).

En seis animales (21,43%) se detectó ADN proviral previamente a la detección de anticuerpos (grupo 3). En muchos de ellos la detección por PCR se hizo negativa en el mismo momento que la prueba ELISA dio positiva, sugiriendo este resultado un control de las células infectadas por los anticuerpos. En este grupo la presencia de anticuerpos fue detectable pasado entre un mes y 5 meses después de la primera detección de ADN proviral.

Tabla V.2: Agrupación de las ovejas incluidas en el estudio de seguimiento según su evolución de aparición de anticuerpos detectables por ELISA y de ADN proviral detectable por PCR-*pol*.

Grupo	Características	Animales	Frecuencia
1	Siempre PCR- y ELISA-	m5269pc, 329, 332, 337, 345, 347, 355, 97047, 97084	32,14%
2	Siempre PCR- y ELISA+	307, 312, 319, 344	14,28%
3	PCR+ antes de ELISA+	308, 309, 310, 314, 333, 343	21,43%
4	ELISA+ antes de PCR+	m5236pc, 328, 340, 356	14,28%
5	ELISA+ con el tiempo pero nunca PCR+	348, 97n109	7,14%
6	PCR- y ELISA- y con el tiempo PCR+ y ELISA+	m9677pv, 321	7,14%
7	PCR+ y ELISA+ y con el tiempo PCR- y ELISA-	300	3,57%

Cuatro ovejas (14,28%) fueron positivas por ELISA previamente a la detección de ADN proviral (grupo 4). Aún siendo el número de ovejas pequeño, parece que los anticuerpos no fueron tan eficientes como en el grupo 3 en reducir la presencia de células infectadas y por tanto se detectó provirus en la leche procedente de las dos ubres.

Dos animales (7,14%) fueron inicialmente ELISA negativo pero finalmente seroconvirtieron, pasando a ser ELISA positivo (grupo 5); a pesar de ello nunca fue detectado ADN proviral. En cualquier caso, debido al bajo número de muestras en estas dos ovejas, podría ser que pertenecieran al grupo 4 y finalmente llegaran a ser PCR positivo. En otras dos ovejas (7,14%) se detectaron ADN proviral y anticuerpos con el tiempo (grupo 6), pero la evolución de la infección permanece desconocida pues el estudio terminó ese mes. Finalmente una oveja (3,57%) fue PCR y ELISA positivo en la primera muestra (grupo 7). Este fue el único animal en el que se no se volvió a detectar anticuerpos.

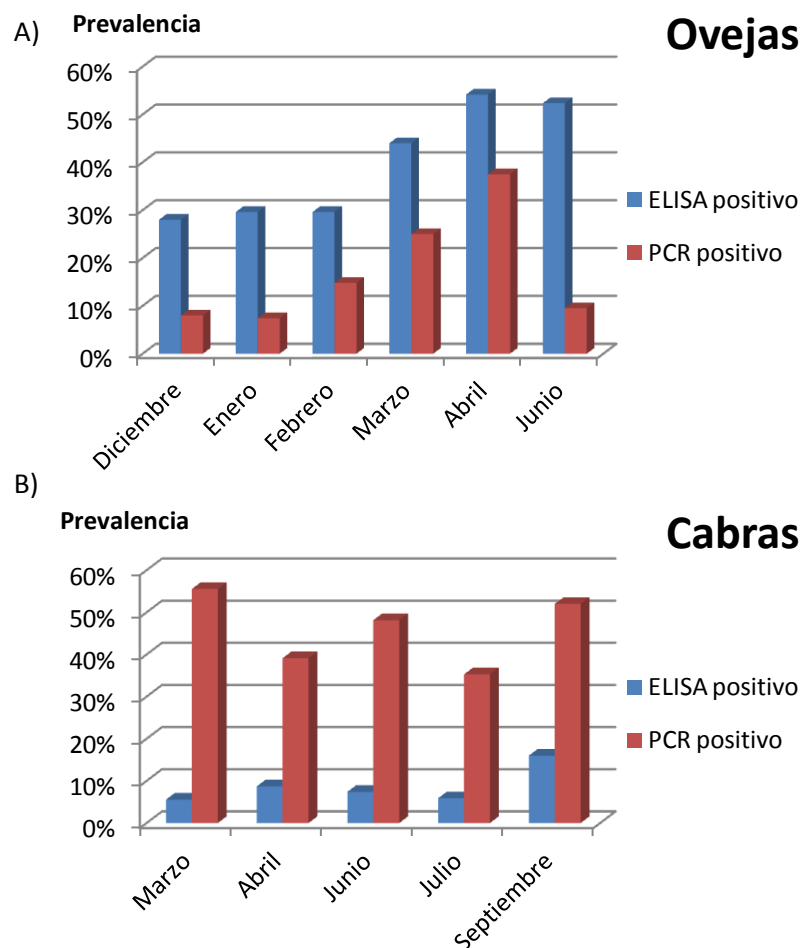


Figura V.1: Evolución en el tiempo de las prevalencias de anticuerpos específicos y ADN proviral en leche de ovejas (A) y cabras (B).

V.3.2. Evolución de la infección en cabras

Como en el caso de las ovejas, se analizaron por ELISA muestras de leche de la mama derecha e izquierda de diez cabras. Los resultados fueron los mismos para las dos ubres (9 fueron negativas y una positiva). Consecuentemente, la leche de ambas mamas de cada animal fue mezclada para la detección de anticuerpos. También se examinó la presencia de ADN proviral en la leche de cada ubre de forma separada y, a diferencia de las ovejas, los resultados de PCR de ambas mamas fueron siempre los mismos. Los resultados por mes se muestran en la Tabla V.3 y Figura V.1 Aproximadamente la mitad de las cabras estudiadas (45,2%) fueron siempre negativas. El mayor porcentaje de animales positivos a SRLV se dio al comienzo del estudio en Marzo y osciló ente 35,3% y 55,6% durante el periodo de estudio. La presencia de anticuerpos y de ADN proviral no evolucionaron paralelos durante los seis meses de estudio, pero también fue diferente a los resultados de ovejas. Las diferencias mensuales en el porcentaje de cabras seropositivas no fueron estadísticamente significativas, como tampoco lo fueron cuando se compararon los resultados de PCR mes a mes. Un alto porcentaje de animales fue persistentemente PCR positivo, y los anticuerpos no parecían ser capaces de controlar la infección. Además, la presencia de virus en leche fue bilateral, pues los resultados de PCR fueron los mismos en mama derecha e izquierda. Solo tres cabras (9,67%) seroconvirtieron durante el periodo de estudio, a diferencia de las 12 ovejas que lo hicieron (42,85%).

Tabla V.3: Evolución de la prevalencia mensual de cabras positivas a SRLV por ELISA y PCR. Los resultados de PCR en las dos mamas fueron coincidentes. Prevalencia global: porcentaje de animales ELISA y/o PCR positivos. ELISA+, resultado positivo a la prueba de ELISA. PCR+, resultado positivo a la prueba de la PCR.

Mes	Número de cabras	Prevalencia ELISA+	Prevalencia PCR+	Prevalencia global
Marzo	18	5,56%	55,56%	55,56%
Abril	23	8,70%	39,13%	39,13%
Junio	27	7,41%	48,15%	48,15%
Julio	17	5,88%	35,29%	35,29%
Septiembre	25	16,00%	52,00%	52,00%

De forma similar a las ovejas, clasificamos las cabras en cuatro grupos en función de los resultados de ELISA y de PCR (Tabla V.4). Las cabras del grupo 1 (45,2%) nunca fueron positivas a SRLVs, ni por ELISA ni por PCR. Los animales pertenecientes al grupo 2 (32,3%) siempre fueron positivos a PCR. Una de estas diez cabras fue además siempre positiva a ELISA y otra finalmente seroconvirtió durante el periodo de estudio, pero las otras ocho cabras fueron siempre seronegativas. En tres cabras (9,7%), que inicialmente eran PCR negativo, se detectó con el tiempo ADN proviral (grupo 3), seroconvirtiendo una de ellas al final del periodo de observación. Finalmente, en el grupo 4 incluimos animales en los que ADN proviral fue detectado al principio del estudio pero que llegaron a ser PCR negativo con el tiempo (12,9%). Sólo una de las cabras de este grupo seroconvirtió durante el estudio.

Tabla V.4: Agrupación de las cabras incluidas en el estudio de seguimiento según su evolución de aparición de anticuerpos detectables por ELISA, y de ADN proviral detectable por PCR-*pol*.

Grupo	Características	Animales	Frecuencia
1	Siempre PCR- y ELISA-	2031, 2035, 3008, 4018, 4208, 4290, 5054, 5377, 5383, 7050, 7078, 7140, 7487, 7488	45,16%
2	Siempre PCR+	2070, 5034, 5098, 5117, 5240, 5287, 5419*, 6153**, 7004, 7077	32,26%
3	PCR- y con el tiempo PCR+	4273*, 6013, 7020	9,68%
4	PCR+ y con el tiempo PCR-	4039, 4193, 5289*, 7210	12,90%

*Seroconversión; **siempre seropositiva durante el periodo de estudio.

V.3.3. Relación entre la evolución de la infección en el tiempo y variables relacionadas con la presencia de mastitis

En el caso de las ovejas no se encontró relación entre la presencia de anticuerpos en leche con ninguna de las variables analizadas. Por el contrario, el recuento de células somáticas estaba significativamente elevado en las ovejas PCR-positivo ($p < 0,034$). Además, aunque no fue estadísticamente significativo, el recuento de células somáticas fue superior en

la mama derecha que en la izquierda, lo que podría estar relacionado con el hecho de que se obtuvieran más resultados positivos por PCR en esa mama.

En las ovejas de seguimiento, el microorganismo aislado con mayor frecuencia fue *Staphylococcus epidermidis*. Tanto en los animales seropositivos como en los seronegativos, el porcentaje de animales con infección bacteriana fue aproximadamente del 20%, no existiendo relación entre estos dos parámetros. Sin embargo, en el caso de la PCR aunque no hubo una diferencia estadísticamente significativa, el porcentaje de ovejas PCR positivo con infección bacteriana (34,6%) fue casi el doble que las que tuvieron PCR negativo (18,3%).

Aunque las ovejas se encontraban entre la primera y quinta lactación, sólo los animales en la segunda lactación fueron positivos a PCR y/o ELISA. Esta asociación no fue estadísticamente significativa, posiblemente debido al bajo número de animales y al elevado de categorías para realizar el análisis. El resto de parámetros analizados no resultó en diferencias estadísticamente significativas ni tendencias dignas de mención.

En el caso de las cabras del estudio de seguimiento no se recogieron datos de recuento de células somáticas. Al hacer el análisis no se encontró relación estadísticamente significativa entre ninguna de las variables analizadas (presencia de mastitis, número de lactación, mes de lactación, el estar o no vacunadas) y la presencia de infección bacteriana con la detección de anticuerpos en leche ni con la de ADN proviral.

Las cabras positivas a ELISA se encontraban en la tercera, cuarta y quinta lactación. Con respecto a la PCR, hubo presencia de ADN proviral prácticamente en todas las lactaciones pero el porcentaje se incrementó hasta la tercera lactación cuando alcanzó la máxima frecuencia y después disminuyó (Figura V.2). Por tanto, el pico de eliminación vírica se produjo en la tercera lactación, lo que a su vez coincidió con el momento en que se detectaron anticuerpos en la leche, reduciéndose a partir de entonces. Además, el mayor porcentaje de mastitis subclínica se produjo en los animales en la cuarta lactación. Al igual que en las ovejas, en cabras la especie bacteriana aislada con mayor frecuencia fue *Staphylococcus epidermidis*, en animales tanto SRLV-positivos como en SRLV-negativos.

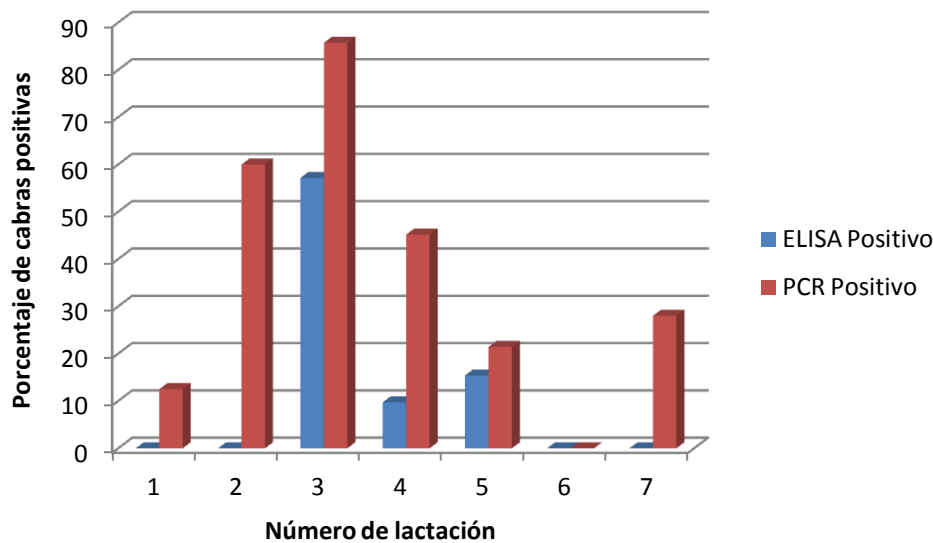


Figura V.2: Evolución según el número de lactación del porcentaje de cabras con anticuerpos específicos y con ADN proviral en leche.

V.4. Discusión

Como se comentó en el Apartado III, son muchos los estudios que describen la falta de concordancia entre métodos diagnósticos para lentivirus de pequeños rumiantes (Brodie et al., 1992; Clements y Zink, 1996; Celer et al., 2000; Juste et al., 2001; Kuzmak et al., 2003; De Andres et al., 2005; Barquero et al., 2011). Se ha sugerido que estas discordancias se deben a las propias técnicas diagnósticas, aunque también podrían deberse a la evolución de los anticuerpos y a la presencia de virus en el animal, puesto que se ha demostrado que ésta se modifica con el tiempo (Blacklaws, 2012). Los resultados del estudio presentado muestran que la presencia de anticuerpos y ADN proviral en leche, tanto de ovejas como cabras, puede variar con el tiempo. Este hecho podría explicar los bajos coeficientes kappa que se observan cuando se comparan pruebas diagnósticas y apoyaría la hipótesis de que la combinación de técnicas diagnósticas podría mejorar la detección de animales infectados por SRLVs y, por tanto, mejorar las campañas de control y erradicación.

En el caso de las ovejas se encontró que el número de células inflamatorias en leche estaba significativamente elevado en el grupo PCR-positivo, lo que relaciona la presencia de ADN viral en la leche con un aumento de células inflamatorias en la misma. Sánchez et al. (2001) encontraron un incremento significativo de células inflamatorias en la leche en cabras

seropositivas a CAEV. Sin embargo, en nuestro estudio esa relación no se da en los animales seropositivos, lo que concuerda con lo observado por Kaba et al. (2012), pues estos autores no encontraban relación entre recuento de células somáticas (RCS) y resultado seropositivo a CAEV. El hecho de que sí que exista relación entre el RCS y la detección vírica por PCR, pero no con la presencia de anticuerpos, apoyaría de forma indirecta la posibilidad de que los anticuerpos neutralizantes tengan algún papel en ayudar a que se reduzca el número de células inflamatorias en leche. Este hecho es importante, además, porque la detección de ADN proviral debido a un aumento de células inflamatorias en leche también está relacionado con la transmisión lactogénica.

La evolución de la infección fue diferente en ovejas y cabras. En ovejas la presencia de anticuerpos en la mama parecía reducir la detección de ADN proviral. Sin embargo, en las cabras hubo más animales persistentemente PCR-positivos y un bajo porcentaje de seroconversión. Esto parece indicar que el papel que juegan los anticuerpos a nivel de la patogenia en ovejas y cabras podría ser diferente, aunque se necesitarían estudios con mayor número de animales y de una duración más larga para poder confirmarlo.

En algunas ovejas (grupo 3) se detectó genoma vírico previo a la detección de anticuerpos. La seroconversión osciló entre 1 y 5 meses después de la detección proviral, lo que concuerda con datos de estudios experimentales, donde la seroconversión puede tardar hasta seis meses (Amorena et al., 2001). Sólo dos animales del grupo 3 fueron simultáneamente PCR-positivo y ELISA-positivo; las otras cuatro ovejas pasaron a ser PCR-negativo cuando seroconvirtieron. Esto podría estar relacionado con lo que hemos comentado anteriormente, en el sentido de que los anticuerpos podrían tener una cierta actividad neutralizante o bien, si no neutralizante, podrían ayudar a disminuir el número de células inflamatorias en leche, y como consecuencia, la carga vírica. La existencia de anticuerpos neutralizantes en ovejas fue descrita por Narayan et al. (1985). En estudios *in vitro*, la cinética de neutralización fue muy lenta, anulándose la infectividad a los 90 minutos de la exposición de los anticuerpos al virus. Con respecto a la capacidad de replicación, los anticuerpos neutralizantes sólo tenían efecto sobre ella si el virus se había anclado a la superficie celular, pero no cuando los viriones estaban libres (Kennedy-Stoskopf y Narayan, 1986).

Las ovejas del grupo 4 fueron ELISA-positivo antes de la detección de ADN proviral en leche. Un animal llegó a ser positivo a PCR en Enero y se mantuvo en los muestreos

posteriores. Sin embargo, las otras tres ovejas del grupo fueron PCR-negativas hasta Abril. Estos resultados podrían ser debidos a factores estacionales, o incluso preñez y lactación. Algunos autores han publicado fases de baja expresión viral y reactivación en la infección por CAEV, coincidiendo con la lactación (Lairmore et al., 1988). Esto sugiere que quizá haya factores hormonales relacionados. A este respecto estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que las concentraciones elevadas de progesterona inhiben la expresión de MVV, disminuyendo esta inhibición a medida que se diluye la hormona. Durante la gestación la concentración de progesterona es elevada, disminuyendo drásticamente durante el parto y la lactación, lo que podría permitir replicarse al virus (manuscrito en preparación). Otra posible explicación podría ser que la infección por SRLV resida en otra localización orgánica, como los pulmones o las articulaciones y con el tiempo llegue a afectar a la mama, debido a una infección secundaria u a otro tipo de patología en la glándula mamaria.

En las ovejas del grupo 2, nunca se detectó ADN proviral, pero fueron seropositivas en leche en todas las muestras. Es posible que la respuesta inmune humoral hubiera reducido el número de células inflamatorias infectadas y, por tanto, el virus no fuera detectado por la técnica de PCR. Por otro lado, también es posible que estos animales estuvieran desarrollando la infección por MVV en otra localización orgánica, como se ha comentado en el párrafo precedente.

Una oveja positiva tanto a PCR como a ELISA llegó ser negativa a ambas pruebas (grupo 7). Es poco probable que fuera un falso positivo ya que se trata de dos técnicas diagnósticas diferentes, que además detectan resultados de la infección viral distintos, pues el ELISA detecta anticuerpos y la PCR ADN proviral. Asimismo la PCR de ambas mamas fue positiva. Una posible explicación es que la infección en esta oveja se hubiera resuelto, lo que estaría en concordancia con observaciones de eliminación de la infección publicadas (Herrmann-Hoesing et al., 2007).

La seroconversión en cabras fue menos eficiente que en ovejas. A pesar de que el 55,6% de las cabras fue positiva a PCR, sólo el 12,9% de las mismas desarrolló anticuerpos anti-SRLV. El bajo número de animales seropositivos podría ser explicado por la falta de especificidad del test al haber sido desarrollado para ovejas, aunque esta misma técnica ELISA ha sido utilizada en cabras con éxito por otros autores (Brinkhof et al., 2010). Es importante reseñar que los animales positivos siguieron siendo positivos con el tiempo. No se puede excluir la posibilidad de que la infección se produjera por una cepa diferente de CAEV

que no indujera anticuerpos que pudieran ser detectados por la técnica ELISA empleada. Otra posible explicación podría ser que el título de anticuerpos fuera más bajo en las cabras que en las ovejas. En estas últimas, el mayor nivel de anticuerpos se produce entre los días 49 y 77 post infección (p.i.), y se reducen progresivamente hasta el día 271 p.i., cuando se alcanzan los niveles más bajos (Adams et al., 1980). El rebaño estudiado estaba naturalmente infectado, por lo que no se puede precisar en qué momento se había producido la infección y esto podría estar relacionado con títulos bajos de anticuerpos y, por tanto, fallo en la detección serológica.

A su vez, Clements y Zink (1996) describieron que en la infección natural por lentivirus la replicación vírica está estimulada por el parto y continúa durante la lactación. Finalmente, la expresión vírica remite como consecuencia de la involución de la mama. Milhau et al. (2005), a raíz de sus experimentos con diferentes estirpes celulares de la glándula mamaria, consideran que debe existir un papel protector humoral, pues los índices de infección *in vitro* son considerablemente más altos que *in vivo*. En los primeros momentos de la infección el número de monocitos infectados es bajo, incrementándose al final de la gestación y perdurando durante la lactación, pero la respuesta inmune puede tardar en desarrollarse. Esto, unido a las sucesivas gestaciones, provocaría a la larga la instauración de una hiperplasia linfoide y fibrosis en la mama. Los resultados de nuestro estudio muestran que las cabras seropositivas se encontraban en la tercera, cuarta y quinta lactación. Y aunque hubo presencia de ADN proviral prácticamente en todas las lactaciones, el porcentaje se incrementaba hasta la tercera lactación cuando alcanzaba la máxima frecuencia y después disminuía.

Independientemente de la sensibilidad de la técnica ELISA, en cabras un alto porcentaje de animales fueron persistentemente positivos a PCR, contrariamente a lo que ocurría en ovejas cuya detección de ADN proviral en leche era ≤ 3 meses. Esto parece indicar que los anticuerpos en las cabras no tienen el mismo efecto reductor de la presencia vírica que en ovejas. Tanto Oliver et al. (1981) como Narayan et al. (1985) realizaron experimentos en los que se demostraba que los anticuerpos producidos en las infecciones por CAEV no eran neutralizantes. De la misma forma, en nuestro estudio, no se observó un carácter reductor de los anticuerpos sobre la carga vírica. Aunque es posible que la alta incidencia de agalaxia del rebaño pudiera tener un efecto negativo en el desarrollo de anticuerpos y producir cierto efecto de inmunosupresión, consideramos que esto es improbable pues otros

estudios han mostrado un buen desarrollo de anticuerpos en animales con agalaxia (Sanchis et al., 2000).

Las cuatro cabras del grupo 4 dejaron de tener resultados PCR positivo en leche en ausencia de una evidente respuesta humoral. Esto podría explicarse por el efecto de linfocitos T citotóxicos, que eliminarían las células infectadas por mecanismos de inmunidad celular. Estudios previos han mostrado que estas células son importantes en el control de la infección (Wu et al., 2008).

Los resultados del estudio presentado en esta tesis pueden explicar la falta de concordancia entre pruebas diagnósticas que ha sido observada por numerosos autores (Brodie et al., 1992; Clements and Zink 1996; Celer et al., 2000; Juste et al., 2001; Kuzmak et al., 2003; De Andres et al., 2005; Barquero et al., 2011). En el caso de las ovejas, la respuesta inmune humoral parece reducir la presencia vírica en leche. Sin embargo, en las cabras el virus permanece más tiempo en la mama y la respuesta inmune humoral tarda más tiempo en desarrollarse. Parece que la presencia vírica en la leche está relacionada con el número de células inflamatorias presentes en dicho fluido, por tanto cualquier patología que estimule la inflamación en la mama puede potencialmente aumentar la liberación vírica lo que es importante para la transmisión.

VI. Conclusiones

PRIMERA

La técnica de ELISA para el diagnóstico de lentivirus de pequeños rumiantes (SRLVs) aporta información similar en leche y en sangre, con la ventaja de que la toma de muestra de leche es más sencilla y estresa menos al animal. Dado que la mayor parte de los animales en las explotaciones son hembras de producción lechera, la recogida de muestras se facilita enormemente, pudiendo esto salvar escollos en la cooperación en las explotaciones a la hora de establecer campañas para el control y posible erradicación de la infección.

SEGUNDA

La eficiencia de las dos técnicas de PCR empleadas para el diagnóstico de SRLVs en ovejas y en cabras fue muy variable, siendo la técnica *PCR-LTR* menos sensible. Esto podría ser debido a la alta mutabilidad de los SRLVs por lo que sería aconsejable diseñar PCRs específicas que se ajusten a la cepa vírica prevalente en cada área.

TERCERA

La aplicación conjunta de las técnicas de ELISA y PCR para el diagnóstico de SRLVs aumenta el número de animales infectados detectados. Por tanto, recomendamos combinar PCR y ELISA para obtener una información más precisa sobre la infección por SRLVs. Al utilizar ambas técnicas de forma complementaria se reduce el número de falsos negativos, siendo más eficaz a la hora de controlar la enfermedad y de planificar campañas de erradicación.

CUARTA

La prevalencia de las infecciones por SRLVs en la zona estudiada (Castilla la Mancha y Madrid) fue muy alta, e incluso superior a otras zonas de España. Por tanto, es necesario aplicar medidas de control efectivas en esta región. La prevalencia de la infección por SRLVs en cabras, aunque elevada, fue inferior que en ovejas. La baja detección de anticuerpos específicos en cabras podría deberse a que el método de ELISA empleado no reconozca eficazmente a los anticuerpos caprinos.

QUINTA

La infección por SRLVs en ovejas se encuentra fuertemente asociada con el sistema de explotación y la localización geográfica, aunque es posible que factores de manejo como el tipo de ordeño sean la razón de esta aparente asociación geográfica. La relación con el tipo de explotación sea probablemente debida a que el hacinamiento de los animales favorece la transmisión. Por tanto, las medidas de control que reduzcan el hacinamiento ayudarán a reducir el número de nuevos casos de infección.

SEXTA

La infección por SRLVs parece reducir la productividad tanto de ovejas como de cabras, aunque estas diferencias no fueron significativas. Es posible que el tamaño de la muestra impida determinar eficientemente esas diferencias, pero el hecho de que se observe el mismo efecto en dos rebaños diferentes de especies distintas hace pensar que esta disminución en la productividad no se debe meramente al azar.

SEPTIMA

La calidad de la leche no parece verse afectada por la infección por SRLVs ni en ovejas ni en cabras. Sin embargo, son necesarios estudios más amplios con mayor número de animales para poder realmente descartar que la infección por SRLVs afecte a la calidad de la leche.

OCTAVA

La discrepancia entre las técnicas PCR y ELISA para el diagnóstico de SRLVs podrían estar relacionadas con la evolución de la infección en el tiempo. Al contrario que en las cabras, en las ovejas la respuesta humoral parece ser efectiva en la limitación de la presencia vírica en leche.

VII. Bibliografía

- Adams, D.S., Crawford, T.B., Banks, K.L., McGuire, T.C., Perryman, L.E. 1980. Immune responses of goats persistently infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Infect Immun*, 28: 421-427.
- Adams, D.S., Klevjer-Anderson, P., Carlson, J.L., McGuire, T.C., Gorham, J.R. 1983. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am J Vet Res*, 44: 1670-1675.
- Alba, A., Allepuz, A., Serrano, E., Casal, J. 2008. Seroprevalence and spatial distribution of maedi-visna virus and pestiviruses in Catalonia (Spain). *Small Rum Res*, 78: 80-86.
- Amorena, B., Monleón, E., Pacheco, C., Pérez, M., Monzón, M., Gracia, E., Rota, C. 1997. Tendencias actuales en los métodos de diagnóstico de interés epidemiológico. *Med Vet*, 14: 305-318.
- Amorena, B., Gonzalez, B., de Andres, S., de Andres, D., Vargas, A., Lujan, L. 2001. Mecanismos patogénicos y respuesta inmune. *Ovis*, 72: 27-38.
- Andresdottir, V., Skraban, R., Matthiasdottir, S., Lutley, R., Agnarsdottir, G., Thorsteinsdottir, H. 2002. Selection of antigenic variants in maedi-visna virus infection. *J Gen Virol*, 83: 2543-2551.
- Andresson, O.S., Elser, J.E., Tobin, G.J., Greenwood, J.D., Gonda, M.A., Georgsson, G., Andresdottir, V., Benediksdottir, E., Carlsdottir, H.M., Mantyla, E.O. 1993. Nucleotide sequence and biological properties of a pathogenic proviral molecular clone of neurovirulent visna virus. *Virology*, 193: 89-105.
- Angelopoulou, K., Poutahidis, T., Brellou, G.D., Greenland, T., Vlemmas, I. 2008. A deletion in the R region of long terminal repeats in small ruminant lentiviruses is associated with decreased pathology in the lung. *Vet J*, 175: 346-355.
- Arjona, A., Barquero, N., Doménech, A., Tejerizo, G., Collado, V.M., Toural, C., Martín, D., Gomez-Lucia, E. 2007. Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). *J Feline Med Surg*, 9: 14-22.

- Arsenault, J., Dubreuil, P., Girard, C., Simard, C., Belanger, D. 2003. Maedi-visna impact on productivity in Quebec sheep flocks (Canada). *Prev Vet Med*, 59: 125-137.
- Bandeira, D.A., de Castro, R.S., Azevedo, E.O., de Souza Seixas Melo, L., de Melo, C.B. 2009. Seroprevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in goats in the Cariri region, Paraíba state, Brazil. *Vet J*, 180: 399-401.
- Barquero, N., Arjona, A., Doménech, A., Toural, C., de las Heras, A., Fernández-Garayzábal, J.F., Ruiz-Santa Quiteria, J.A., Gomez-Lucia, E. 2011. Diagnostic performance of PCR and ELISA on blood and milk samples and serological survey for small ruminant lentiviruses in central Spain. *Vet Rec*, 168: 20-23.
- Bellet, V., Duval, R., Delebassee, S., Cook-Moreau, J., Bosgiraud, C. 2004. AZT inhibits Visna/maedi virus-induced apoptosis. *Arch Virol*, 149: 583-601.
- Benavides, J., Garcia-Pariente, C., Gelmetti, D., Fuertes, M., Ferreras, M.C., Garcia-Marin, J.F., Perez, V. 2006a. Effects of fixative type and fixation time on the detection of Maedi Visna virus by PCR and immunohistochemistry in paraffin-embedded ovine lung samples. *J Virol Methods*, 137: 317-324.
- Benavides, J., Fuertes, M., Garcia-Pariente, C., Ferreras, M.C., Garcia Marin, J.F., Perez, V. 2006b. Natural cases of visna in sheep with myelitis as the sole lesion in the central nervous system. *J Comp Pathol*, 134: 219-230.
- Benavides, J., Garcia-Pariente, C., Fuertes, M., Ferreras, M.C., Garcia-Marin, J.F., Juste, R.A., Perez, V. 2009. Maedi-visna: the meningoencephalitis in naturally occurring cases. *J Comp Pathol*, 140:1-11.
- Berriatua, E., Alvarez, V., Extramiana, B., Gonzalez, L., Daltabuit, M., Juste, R. 2003. Transmission and control implications of seroconversion to Maedi-Visna virus in Basque dairy-sheep flocks. *Prev Vet Med*, 60: 265-279.
- Bertoni, G., Zahno, M.L., Zanoni, R., Vogt, H.R., Peterhans, E., Ruff, G., Cheevers, W.P., Sonigo, P., Pancino, G. 1994. Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane protein associates with the development of arthritis. *J Virol*, 68: 7139-7147.

- Biescas, E., Preziuso, S., Bulgin, M., De Martini, J.C. 2005. Ovine lentivirus-associated leucomyelitis in naturally infected North American sheep. *J Comp Pathol*, 132: 107-116.
- Bird, P., Reyburn, H.T., Blacklaws, B.A., Allen, D., Nettleton, P., Yirrell, D.L., Watt, N., Sargan, D., McConnell, I. 1995. The restricted IgG1 antibody response to maedi visna virus is seen following infection but not following immunization with recombinant gag protein. *Clin Exp Immunol*, 102: 274-280.
- Blacklaws, B.A. 2012. Small ruminant lentiviruses: immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 35: 259-269.
- Blacklaws, B.A., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Watt, N.J., de Andres, D., Klein, D., Harkiss, G.D. 2004. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol*, 101: 199-208.
- Bolea, R., Monleon, E., Carrasco, L., Vargas, A., de Andres, D., Amorena, B., Badiola, J.J., Lujan, L. 2006. Maedi-visna virus infection of ovine mammary epithelial cells. *Vet Res*, 37: 133-144.
- Brinkhof, J.M, van Maanen, C. 2007. Evaluation of five enzyme-linked immunosorbent assays and an agar gel immunodiffusion test for detection of antibodies to small ruminant lentiviruses. *Clin Vaccine Immunol*, 14: 1210-1214.
- Brinkhof, J.M., van Maanen, C., Wigger, R., Peterson, K., Houwers, D.J. 2008. Specific detection of small ruminant lentiviral nucleic acid sequences located in the proviral long terminal repeat and leader-gag regions using real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, 147: 338-344.
- Brinkhof, J.M., Houwers, D.J., Moll, L., Dercksen, D., van Maanen, C. 2010. Diagnostic performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing. *Vet Microbiol*, 142: 193-198.

- Brodie, S.J., Pearson, L.D., Snowden, G.D., De Martini, J.C. 1992. Host-virus interaction as defined by amplification of viral DNA and serology in lentivirus-infected sheep. *Arch Virol*, 130: 413-428.
- Bruett, L., Barber, S.A., Clements, J.E. 2000. Characterization of a membrane-associated protein implicated in visna virus binding and infection. *Virology*, 271: 132-141.
- Brulisauer, F., Vogt, H.R., Perler, L., Rufenacht, J. 2005. Risk factors for the infection of Swiss goat herds with small ruminant lentivirus: a case-control study. *Vet Rec*, 157: 229-233.
- Burgu, I., Akca, Y., Alkan, F., Ozkul, A., Karaoglu, T., Cabalar, M. 1994. Antibody prevalence of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) in goats in Turkey. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 101: 390-391.
- Celer, V.Jr., Celer, V., Nejedla, E., Bertoni, G., Peterhans, E., Zanoni, R.G. 2000. The detection of proviral DNA by semi-nested polymerase chain reaction and phylogenetic analysis of Czech Maedi-Visna isolates based on gag gene sequences. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 47: 203-215.
- Clements, J.E., Hu, L., Lindstrom, L., Powell, A., Rexroad, C., Zink, M.C. 1996. Molecular studies of visna virus gene expression: analysis of envelope gene expression in transgenic sheep. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 12: 421-423.
- Cost action 834, Lentiviruses of sheep and goats: pathogenesis, diagnosis and prevention. Workshop: "Ovine and caprine lentiviral infections: molecular epidemiology and development of new diagnostic techniques". Management Committee meeting held on Friday 12th October 2001 in the Veterinary Faculty, Dublin, Ireland.
- Cottureau, A., Laval, A., Jeanpert, A. 1977. Identification de Maedi dans l'est de la France. *Bull Acad Vét de France*, 50: 223-232.
- Crane, S.E., Kanda, P., Clements, J.E. 1991. Identification of the fusion domain in the visna virus transmembrane protein. *Virology*, 185: 488-492.

- Crawford, T.B., Adams, D.S., Sande, R.D., Gorham, J.R., Henson, J.B. 1980. The connective tissue component of the caprine arthritis-encephalitis syndrome. *Am J Pathol*, 100: 443-454.
- Crespo, H., Reina, R., Glaria, I., Ramírez, H., de Andrés, X., Jáuregui, P., Luján, L., Martínez-Pomares, L., Amorena, B., de Andrés, D.F. 2011. Identification of the ovine mannose receptor and its possible role in Visna/Maedi virus infection. *Vet Res*, 7: 42: 28-37.
- Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., Brogden, K.A., Sacks, J.M. 1986. Breed susceptibility to ovine progressive pneumonia (maedi/visna) virus. *Vet Microbiol*, 12: 283-288.
- Da Silva Teixeira, M.F., Lambert, V., Mselli-Lakahl, L., Chettab, A., Chebloune, Y., Mornex, J.F. 1997. Immortalization of caprine fibroblasts permissive for replication of small ruminant lentiviruses. *Am J Vet Res*, 58: 579-584.
- Dawson, M. 1987. Pathogenesis of maedi-visna. *Vet Rec*, 120: 451-454.
- Dawson, M., Wilesmith, J.W. 1985. Serological survey of lentivirus (maedi-visna/caprine arthritis-encephalitis) infection in British goat herds. *Vet Rec*, 117: 86-89.
- De Andres, D., Klein, D., Watt, N. J., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Blacklaws, B.A., Harkiss, G.D. 2005. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol*, 107: 49-62.
- De la Concha-Bermejillo, A. 1997. Maedi-Visna and ovine progressive pneumonia. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 13: 13-33.
- De la Concha-Bermejillo, A., Brodie, S.J., Magnus-Corral, S., Bowen, R.A., De Martini, J.C. 1995. Pathologic and serologic responses of isogeneic twin lambs to phenotypically distinct lentiviruses. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 8: 116-123.
- De la Concha-Bermejillo, A., Singh, B., Whitney, M.S., Bazer, F.W. 2000. Acute-phase proteins and hematologic values in ovine lentivirus-infected lambs treated with recombinant ovine IFN-tau. *J Interferon Cytokine Res*, 20: 41-53.

- De la Cruz M., Serrano, E., Montoro, V., Marco, J., Romeo, M., Baselga, R., Albizu, I., Amorena, A. 1994. Etiology and prevalence of subclinical mastitis in the Manchega sheep at mid-late lactation. *Small Rum Res*, 14: 175-180.
- DeMartini, J.C., Halsey, W., Boshoff, C., York, D., Howell, M.D. 1999. Comparison of a maedi-visna virus CA-TM fusion protein ELISA with other assays for detecting sheep infected with North American ovine lentivirus strains. *Vet Immunol Immunopathol*, 71: 29-40.
- Dohoo, I.R., Heaney, D.P., Stevenson, R.G., Samagh, B.S., Rhodes, C.S. 1987. The effect of maedi-visna virus infection on productivity in ewes. *Prev Vet Med*, 4: 471-484.
- Dukes, T.W., Greig, A.S., Corner, A.H. 1979. Maedi-visna in Canadian sheep. *Can J Comp Med*, 43: 313-320.
- Dungu, B., Vorster, J., Bath, G.F., Verwoerd, D.W. 2000. The effect of a natural maedi-visna virus infection on the productivity of South African sheep. *Onderstepoort J Vet Res*, 67: 87-96.
- Eltahir, Y.M., Dovas, C.I., Papanastassopoulou, M., Koumbati, M., Giadinis, N., Verghese-Nikolakaki, S., Koptopoulos, G. 2006. Development of a semi-nested PCR using degenerate primers for the generic detection of small ruminant lentivirus proviral DNA. *J Virol Methods*, 135: 240-246.
- Extramiana, A.B., Gonzalez, L., Cortabarría, N., Garcia, M., Juste, R.A. 2002. Evaluation of a PCR technique for the detection of MVV proviral DNA in blood milk and tissue samples in naturally infected sheep. *Small Rum Res*, 44:109-118.
- Gazit, A., Mashiah, P., Kalinski, H., Gast, A., Rosin-Abersfeld, R., Tronick, S.R., Yaniv, A. 1996. Two species of Rev proteins, with distinct N termini, are expressed by caprine arthritis encephalitis virus. *J Virol*, 70: 2674-2677.
- Georgsson, G., Houwers, D.J., Palsson, P.A., Petursson, G. 1989. Expression of viral antigens in the central nervous system of visna-infected sheep: an immunohistochemical study on experimental visna induced by virus strains of increased neurovirulence. *Acta Neuropathol*, 77: 299-306.

- Gianguaspero, M., Vanopdenbosch, E., Nishikawa, H. 1992. Lentiviral arthritis and encephalitis in goats in north-west Syria. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*, 45: 241.
- Gil, A., Rola, M., Kuzmak, J. 2006. Application of PCR technique in diagnosis of small ruminant lentivirus infection in sheep and goats. *Pol J Vet Sci*, 9: 213-217.
- Glaria, I., Reina, R., Crespo, H., de Andres, X., Ramirez, H., Biescas, E., Perez, M. M., Badiola, J. Lujan, L., Amorena, B., de Andres, D. 2009. Phylogenetic analysis of SRLV sequences from an arthritic sheep outbreak demonstrates the introduction of CAEV-like viruses among Spanish sheep. *Vet Microbiol*, 138: 156-162.
- Glaria, I., Reina, R., Ramirez, H., de Andres, X., Crespo, H., Jauregui, P., Salazar, E., Lujan, L., Perez, M.M., Benavides, J., Perez, V., Polledo, L., Garcia-Marin, J.F., Riezu, J.I., Borrás, F., Amorena, B., de Andres, D. 2012. Visna/Maedi virus genetic characterization and serological diagnosis of infection in sheep from a neurological outbreak. *Vet Microbiol*, 155: 137-146.
- Gonzalez L., Badiola, J.J., Gelabert, J.L. 1984. Neumonía Progresiva (maedi) en el ganado ovino del País Vasco. *Med. Vet*, 1: 277-284.
- Gonzalez, B., Reina, R., Garcia, I., Andres, S., Glaria, I., Alzueta, M., Mora, M.I., Jugo, B.M., Arrieta-Aguirre, I., de la Lastra, J.M., Rodriguez, D., Rodriguez, J.R., Esteban, M., Grillo, M.J., Blacklaws, B.A., Harkiss, G.D., Chebloune, Y., Lujan, L., de Andres, D., Amorena, B. 2005. Mucosal immunization of sheep with a Maedi-Visna virus (MVV) env DNA vaccine protects against early MVV productive infection. *Vaccine*, 23: 4342-4352.
- González-Rodríguez, M.C., Gonzalo, C., San Primitivo, F., Cármenes, P. 1995. Relationship between somatic cell count and intramammary infection of the half udder in dairy ewes. *J Dairy Sci*, 78: 2753-2759.
- Grewal, A.S., Greenwood, P.E., Burton, R.W., Smith, J.E., Batty, E.M., North, R. 1986. Caprine retrovirus infection in New South Wales: virus isolations, clinical and histopathological findings and prevalence of antibody. *Aust Vet J*, 63: 245-248.

- Gufler, H., Moroni, P., Casu, S., Pisoni, G. 2008. Seroprevalence, clinical incidence, and molecular and epidemiological characterisation of small ruminant lentivirus in the indigenous Passirian goat in northern Italy. *Arch Virol*, 153: 1581-1585.
- Herrmann-Hoesing L.M. 2010. Diagnostic assays used to control small ruminant lentiviruses. *J Vet Diagn Invest*, 22: 843-855.
- Herrmann-Hoesing, L.M., White, S.N., Lewis, G.S., Mousel, M.R., Knowles, D.P. 2007. Development and validation of an ovine progressive pneumonia virus quantitative PCR. *Clin Vaccine Immunol*, 14: 1274-1278.
- Hotzel, I., Cheevers, W. 2002. Differential receptor usage of small ruminant lentiviruses in ovine and caprine cells: host range but not cytopathic phenotype is determined by receptor usage. *Virology*, 301: 21-31.
- Houwens, D.J., Nauta, I.M. 1989. Immunoblot analysis of the antibody response to ovine lentivirus infections. *Vet Microbiol*, 19: 127-139.
- Houwens, D.J., Pekelder, J.J., Akkermans, J.W., van der Molen, E.J., Schreuder, B.E. 1988. Incidence of indurative lymphocytic mastitis in a flock of sheep infected with maedi-visna virus. *Vet Rec*, 122: 435-437.
- Jolly, P.E., Narayan, O. 1989. Evidence for interference, coinfections, and intertypic virus enhancement of infection by ovine-caprine lentiviruses. *J Virol*, 63: 4682-4688.
- Jolly, P.E., Huso, D.L., Sheffer, D., Narayan, O. 1989. Modulation of lentivirus replication by antibodies: Fc portion of immunoglobulin molecule is essential for enhancement of binding, internalization, and neutralization of visna virus in macrophages. *J Virol*, 63: 1811-1813.
- Juste, R., Gelabert, J.L., Saez de Ocariz, C. 1987. Aspectos epizootiológicos de algunas enfermedades del ganado ovino latxo en la comunidad autónoma vasca. I.-Metodología y enfermedades crónicas (maedi y paratuberculosis). *ITEA*. Vol. Extra 7: 230-232.
- Juste, R.A., Varea, R., Monteleon, E. 2001. Diagnóstico del Maedi-Visna. *Ovis*, 72: 59-78.

- Kaba, J., Strzalkowska, N., Jozwik, A., Krzyzewski, J., Bagnicka, E. 2012. Twelve-year cohort study on the influence of caprine arthritis-encephalitis virus infection on milk yield and composition. *J Dairy Sci*, 95: 1617-1622.
- Kenigswald, G., Van-Straten, M. 2009. The effect of maedi visna virus (MVV) positive serology on milk and meat production in Israeli "Assaf" sheep herd. 7Th International Sheep Veterinary Congress. Norway.
- Kennedy, P.G., Narayan, O., Ghotbi, Z., Hopkins, J., Gendelman, H.E., Clements, J.E. 1985. Persistent expression of Ia antigen and viral genome in visna-maedi virus-induced inflammatory cells. Possible role of lentivirus-induced interferon. *J Exp Med*, 162: 1970-1982.
- Kennedy-Stoskopf, S. 1989. Pathogenesis of lentivirus-induced arthritis. A review. *Rheumatol Int*, 9: 129-136.
- Kennedy-Stoskopf, S., Narayan, O. 1986. Neutralizing antibodies to visna lentivirus: mechanism of action and possible role in virus persistence. *J Virol*, 59: 37-44.
- Kennedy-Stoskopf S, Zink, M.C., Jolly, P.E., Narayan, O. 1987. Lentivirus-induced arthritis. Chronic disease caused by a covert pathogen. *Rheum Dis Clin North Am*, 13: 235-247.
- Klein, J.R., Martin, J., Griffing, S., Nathanson, N., Gorham, J., Shen, D.T., Petursson, G., Georgsson, G., Palsson, P.A., Lutley, R. 1985. Precipitating antibodies in experimental visna and natural progressive pneumonia of sheep. *Res Vet Sci*, 38: 129-133.
- Klevjer-Anderson, P., Cheevers, W.P. 1981. Characterization of the infection of caprine synovial membrane cells by the retrovirus caprine arthritis-encephalitis virus. *Virology*, 110: 113-119.
- Knowles, D.P., Jr., 1997. Laboratory diagnostic tests for retrovirus infections of small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 13: 1-11.
- Krieg, A., Peterhans, E. 1990. Caprine arthritis-encephalitis in Switzerland: epidemiologic and clinical studies. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 132: 345-352.

- Krogsrud, J., Udnes, M. 1978. Maedi (progressive interstitial pneumonia in sheep). Diagnosis, epizootiology, prevention and control program in Norway. *Bull. Off. Int. Epizoot*, 89: 451-464.
- Kuzmak, J., Kedziora, A., Rola, M., Kozaczynska, B., Chebloune, Y., Gallay, K. 2003. Evaluation of PCR and PCR/hybridization method for the detection of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Bull Vet Inst Pulawy*, 47: 293-300.
- Lacerenza, D., Giammarioli, M., Grego, E., Marini, C., Profiti, M., Rutili, D., Rosati, S. 2006. Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes. *Vet Immunol Immunopathol*, 112: 264-271.
- Lago, N., Lopez, C., Panadero, R., Cienfuegos, S., Pato, J., Prieto, A., Diaz, P., Mourazos, N., Fernandez, G. 2012. Seroprevalence and risk factors associated with Visna/Maedi virus in semi-intensive lamb-producing flocks in northwestern Spain. *Prev Vet Med*, 103: 163-169.
- Lairmore, M.D., Akita, G. Y., Russell, H. I., DeMartini, J.C. 1987. Replication and cytopathic effects of ovine lentivirus strains in alveolar macrophages correlate with in vivo pathogenicity. *J Virol*, 61: 4038-4042.
- Lairmore, M.D., Butera, S.T., Callahan, G.N., DeMartini, J.C. 1988. Spontaneous interferon production by pulmonary leukocytes is associated with lentivirus-induced lymphoid interstitial pneumonia. *J Immunol*, 140: 779-785.
- Landis, J.R., Koch, G.G. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33: 159-174.
- Larsen, H.J., Hyllseth, B., Krogsrud, J. 1982. Experimental maedi virus infection in sheep: cellular and humoral immune response during three years following intranasal inoculation. *Am J Vet Res*, 43: 384-389.
- Las Heras A., Domínguez, L., Fernández-Garayzabal, J.F. 1999. Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in dairy ewes of the Madrid region. *Small Rum Res*, 32: 21-29.
- Lee, W.C., McConnell, I., Blacklaws, B.A. 1994. Cytotoxic activity against maedi-visna virus-infected macrophages. *J Virol*, 68: 8331-8338.

- Leginagoikoa, I., Juste, R.A., Barandika, J., Amorena, B., De Andres, D., Lujan, L., Badiola, J., Berriatua, E. 2006. Extensive rearing hinders Maedi-Visna Virus (MVV) infection in sheep. *Vet Res*, 37: 767-778.
- Leginagoikoa I., Minguíjon, E., Juste, R.A., Barandika, J., Amorena, B., de Andres, D., Badiola, J.J., Lujan, L., Berriatua, E. 2010. Effects of housing on the incidence of visna/maedi virus infection in sheep flocks. *Res Vet Sci*, 88: 415-421.
- Legrottaglie, R., Martini, M., Barsotti, G., Agrimi, P. 1999. The effects of ovine lentivirus infection on some productive aspects in a Sardinian sheep flock from Italy. *Vet Res Commun*, 23: 123-131.
- Leitner, G., Krifucks, O., Weisblit, L., Lavi, Y., Bernstein, S., Merin, U. 2010. The effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on production in goats. *Vet J*, 183: 328-331.
- Leroux, C., Vuillermoz, S., Mornex, J.F., Greenland, T. 1995. Genomic heterogeneity in the pol region of ovine lentiviruses obtained from bronchoalveolar cells of infected sheep from France. *J Gen Virol*, 76: 1533-1537.
- Leroux, C., Lerondelle, C., Chastang, J., Mornex, J.F. 1997a. RT-PCR detection of lentiviruses in milk or mammary secretions of sheep or goats from infected flocks. *Vet Res*, 28: 115-121.
- Leroux C, Issel, C.J., Montelaro, R.C. 1997b. Novel and dynamic evolution of equine infectious anemia virus genomic quasispecies associated with sequential disease cycles in an experimentally infected pony. *J Virol*, 71: 9627-9639.
- Lujan, L., Garcia Marin, J.F., Fernandez de Luco, D., Vargas, A., Badiola, J.J. 1991. Pathological changes in the lungs and mammary glands of sheep and their relationship with maedi-visna infection. *Vet Rec*, 129: 51-54.
- Lujan, L., Begara, I., Collie, D. D., Watt, N. J. 1993. Phenotypic analysis of cells in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood of maedi visna-infected sheep. *Clin Exp Immunol*, 91: 272-276.
- Luján, L., Gómez, N., Bolea, R., García-Marín, J.F., Varea, R., Vargas, A., Badiola, J.J. 2001. Cuadro clínico y lesional. *Ovis*, 72: 41-57.

- Mazzei, M., Carrozza, M.L., Bandecchi, P., Mazzanti, G., Mannelli, A., Tolari, F. 2005. Evaluation of an ELISA to detect antibodies to maedi-visna virus in individual and pooled samples of milk from sheep. *Vet Rec*, 157: 552-555.
- Milhau, N., Renson, P., Dreesen, I., Greenland, T., Bellaton, C., Guiguen, F., Mornex, J.F., Le Jan, C. 2005. Viral expression and leukocyte adhesion after in vitro infection of goat mammary gland cells with caprine arthritis-encephalitis virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 103: 93-99.
- Murphy, B., Hillman, C., Castillo, D., Vapniarsky, N., Rowe, J. 2012. The presence or absence of the gamma-activated site determines IFN gamma-mediated transcriptional activation in CAEV promoters cloned from the mammary gland and joint synovium of a single CAEV-infected goat. *Virus Res*, 163: 537-545.
- Narayan, O. 1983. Role of macrophages in the immunopathogenesis of visna-maedi of sheep. *Prog Brain Res*, 59: 233-235.
- Narayan, O., Sheffer, D., Clements, J. E., Tennekoon, G. 1985. Restricted replication of lentiviruses. Visna viruses induce a unique interferon during interaction between lymphocytes and infected macrophages. *J Exp Med*, 162: 1954-1969.
- Narayan O., Zink, M.C., Gorrell, M., Crane, S., Huso, D., Jolly, P., Saltarelli, M., Adams, R.J., Clements, J.E. 1993. The lentiviruses of sheep and goats. En “*The Retroviridae*”, Vol. 2, J.A. Levy (ed.). Plenum Press. Nueva York. pp.229-255.
- Nord, K. 1997. CAEV infection does not affect prevalence of bacterial mastitis in goats. *Acta Vet Scand*, 38: 197-199.
- OIE 2008. Artritis-encefalitis caprina y Maedi-Visna. En “Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008”, pp. 1-10. Consultado el 15 de octubre de 2012. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.07.03-04.%20Artritis-Encefalitis%20caprina%20y%20Maedi%20Visna.pdf
- Oliver, R.E., Gorham, J.R., Parish, S.F., Hadlow, W.J., Narayan, O. 1981. Ovine progressive pneumonia: pathologic and virologic studies on the naturally occurring disease. *Am J Vet Res*, 42: 1554-1559.

- Palsson, P.A. 1972. Maedi-Visna. *J Clin Pathol*, 3-6: 115-120.
- Pekelder, J.J., Veenink, G.J., Akkermans, J.P., van Eldik, P., Elving, L., Houwers, D.J. 1994. Ovine lentivirus induced indurative lymphocytic mastitis and its effect on the growth of lambs. *Vet Rec*, 134: 348-350.
- Pepin, M., Vitu, C., Russo, P., Mornex, J. F., Peterhans, E. 1998. Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Vet Res*, 29: 341-367.
- Peretz, G., Bugnard, F., Calavas, D. 1994. Study of a prevention programme for caprine arthritis-encephalitis. *Vet Res*, 25: 322-326.
- Perez M., Biescas, E., de Andres, X., Leginagoikoa, I., Salazar, E., Berriatua, E., Reina, R., Bolea, R., de Andres, D., Juste, R.A., Cancer, J., Gracia, J., Amorena, B., Badiola, J.J., Lujan, L. 2009. Visna/maedi virus serology in sheep: Survey, risk factors and implementation of a successful control programme in Aragon (Spain). *Vet J*, 186: 221-225
- Peterhans, E., Greenland, T., Badiola, J., Harkiss, G., Bertoni, G., Amorena, B., Eliaszewicz, M., Juste, R. A., Krassnig, R., Lafont, J. P., Lenihan, P., Petursson, G., Pritchard, G., Thorley, J., Vitu, C., Mornex, J. F., Pepin, M. 2004. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet Res*, 35: 257-274.
- Pisoni, G., Bertoni, G., Manarolla, G., Vogt, H. R., Scaccabarozzi, L., Locatelli, C., Moroni, P. 2010. Genetic analysis of small ruminant lentiviruses following lactogenic transmission. *Virology*, 407: 91-99.
- Preziuso, S., Taccini, E., Rossi, G., Renzoni, G., Braca, G. 2003. Experimental Maedi Visna Virus Infection in sheep: a morphological, immunohistochemical and PCR study after three years of infection. *Eur J Histochem*, 47: 373-378.
- Quinn, P. J., Carter M.E., Markey B., Carter G.R. 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing. London.
- Reddy, P.G., Sapp, W.J., Heneine, W. 1993. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 31: 3042-3043.

- Reina, R., Mora, M. ., Glaria, I., Garcia, I., Solano, C., Lujan, L., Badiola, J.J., Contreras, A., Berriatua, E., Juste, R., Mamoun, R.Z., Rolland, M., Amorena, B., de Andres, D. 2006. Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Res*, 121: 189-198.
- Reina, R., Barbezange, C., Niesalla, H., de Andres, X., Arnarson, H., Biescas, E., Mazzei, M., Fraissier, C., McNeilly, T.N., Liu, C., Perez, M., Carrozza, M.L., Bandecchi, P., Solano, C., Crespo, H., Glaria, I., Huard, C., Shaw, D. J., de Blas, I., de Andres, D., Tolari, F., Rosati, S., Suzan-Monti, M., Andresdottir, V., Torsteinsdottir, S., Petursson, G., Lujan, L., Pepin, M., Amorena, B., Blacklaws, B., Harkiss, G.D. 2008. Mucosal immunization against ovine lentivirus using PEI-DNA complexes and modified vaccinia Ankara encoding the *gag* and/or *env* genes. *Vaccine*, 26: 4494-4505.
- Reina, R., Berriatua, E., Lujan, L., Juste, R., Sanchez, A., de Andres, D., Amorena, B. 2009. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. *Vet J*, 182: 31-37.
- Reyburn, H.T., Roy, D. J., Blacklaws, B.A., Sargan, D.R., Watt, N.J., McConnell, I. 1992. Characteristics of the T cell-mediated immune response to maedi-visna virus. *Virology*, 191: 1009-1012.
- Rosati, S., Mannelli, A., Merlo, T., Ponti, N. 1999. Characterization of the immunodominant cross-reacting epitope of visna maedi virus and caprine arthritis-encephalitis virus capsid antigen. *Virus Res*, 61: 177-183.
- Rowe, J.D., East, N.E. 1997. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 13: 35-53.
- Rowe, J.D., East, N.E., Franti, C.E., Thurmond, M.C., Pedersen, N.C., Theilen, G.H. 1992. Risk factors associated with the incidence of seroconversion to caprine arthritis-encephalitis virus in goats on California dairies. *Am J Vet Res*, 53: 2396-2403.
- Ruz, J.M., Ramo, A., Abril, F., Tremul, C., Lara, S., Lopez, C., Picazo, R. 2000. Estudio serológico del visna-maedi en 14 explotaciones indemnes de brucelosis pertenecientes a ganaderías de la cooperativa Cotega. XXV Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC). Teruel, pp. 401-405.

- Ryan, S., Tiley, L., McConnell, I., Blacklaws, B. 2000. Infection of dendritic cells by the Maedi-Visna lentivirus. *J Virol*, 74: 10096-10103.
- Saman, E., Van Eynde, G., Lujan, L., Extramiana, B., Harkiss, G., Tolari, F., Gonzalez, L., Amorena, B., Watt, N., Badiola, J. 1999. A new sensitive serological assay for detection of lentivirus infections in small ruminants. *Clin Diagn Lab Immunol*, 6: 734-740.
- Sanchez, A., Contreras, A., Corrales, J.C., Marco, J.C. 2001. Relationships between infection with caprine arthritis encephalitis virus, intramammary bacterial infection and somatic cell counts in dairy goats. *Vet Rec*, 148: 711-714.
- Sanchis, R., Abadie, G., Lambet, M., Cabasse, E., Dufour, P., Guibert, J.M., Pépin, M. 2000. Inoculation of lactating ewes by the intramammary route with *Mycoplasma agalactiae*: comparative pathogenicity of six field strains. *Vet Res*, 31: 329-337.
- Shuaib, M., Green, C., Rashid, M., Duizer, G., Whiting, T.L. 2012. Herd risk factors associated with sero-prevalence of Maedi-Visna in the Manitoba sheep population. *Can Vet J*, 51: 385-390.
- Sigurdardottir, B., Thormar, H. 1964. Isolation of a viral agent from the lungs of sheep affected with Maedi. *J Infect Dis*, 114: 55-60.
- Sihvonen, L., Hirvela-Koski, V., Nuotio, L., Kokkonen, U.M. 1999. Serological survey and epidemiological investigation of maedi-visna in sheep in Finland. *Vet Microbiol*, 65: 265-270.
- Sihvonen, L., Nuotio, L., Rikula, U., Hirvela-Koski, V., Kokkonen, U. 2000. Preventing the spread of maedi-visna in sheep through a voluntary control programme in Finland. *Prev Vet Med*, 47: 213-220.
- Singh, I., McConnell, I., Dalziel, R., Blacklaws, B. A. 2006. Serum containing ovine IgG₂ antibody specific for maedi visna virus envelope glycoprotein mediates antibody dependent cellular cytotoxicity. *Vet Immunol Immunopathol*, 113: 357-366.
- Smith, C. 1992. Ovine lentivirus: a real or imagined threat? *J Am Vet Med Assoc*, 200: 139-143.

- Snowder, G.D., Gates, N.L., Glimp, H.A., Gorham, J.R. 1990. Prevalence and effect of subclinical ovine progressive pneumonia virus infection on ewe wool and lamb production. *J Am Vet Med Assoc*, 197: 475-479.
- Suveges, T., Suveges, T., Szeky, A. 1973. Incidence of Maedi (chronic progressive interstitial pneumonia) among sheep in Hungary. *Acta Vet Acad Sci Hung*, 23: 205-217.
- Tageldin, M.H., Johnson, E.H., Al-Busaidi, R.M., Al-Habsi, K.R., Al-Habsi, S.S. 2012. Serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infection in indigenous goats in the Sultanate of Oman. *Trop Anim Health Prod*, 44: 1-3.
- Toft, N., Akerstedt, J., Tharaldsen, J., Hopp, P. 2007. Evaluation of three serological tests for diagnosis of Maedi-Visna virus infection using latent class analysis. *Vet Microbiol*, 120: 77-86.
- Trujillo, J.D., Hotzel, K.J., Snekvik, K.R., Cheevers, W.P. 2004. Antibody response to the surface envelope of caprine arthritis-encephalitis lentivirus: disease status is predicted by SU antibody isotype. *Virology*, 325: 129-36.
- Turin, L., Pisoni, G., Giannino, M.L., Antonini, M., Rosati, S., Ruffo, G., Moroni, P. 2005. Correlation between milk parameters in CAEV seropositive and negative primiparous goats during an eradication program in Italian farm. *Small Rum Res*, 57: 73-79.
- Valas, S., Benoit, C., Baudry, C., Perrin, G., Mamoun, R. Z. 2000. Variability and immunogenicity of caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein. *J Virol*, 74: 6178-6185.
- Varea, R., Monleon, E., Pacheco, C., Lujan, L., Bolea, R., Vargas, M.A., Van Eynde, G., Saman, E., Dickson, L., Harkiss, G., Amorena, B., Badiola, J.J. 2001. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. *J Vet Diagn Invest*, 13: 301-307.
- Villet, S., Bouzar, B.A., Morin, T., Verdier, G., Legras, C., Chebloune, Y. 2003. Maedi-visna virus and caprine arthritis encephalitis virus genomes encode a Vpr-like but no Tat protein. *J Virol*, 77: 9632-9638.

- Watt, N.J., King, T.J., Collie, D., McIntyre, N., Sargan, D., McConnell, I. 1992. Clinicopathological investigation of primary, uncomplicated maedi-visna virus infection. *Vet Rec*, 131: 455-461.
- Woldemeskel, M., Tibbo, M., Potgieter, L.N. 2002. Ovine progressive pneumonia (Maedi-Visna): an emerging respiratory disease of sheep in Ethiopia. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 109: 486-488.
- Wu, C., Barbezange, C., McConnell, I., Blacklaws, B.A. 2008. Mapping and characterization of visna/maedi virus cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *J Gen Virol*, 89: 2586-2596.
- Zecconi A., Hamann, J., Bronzo, V., Moroni, P., Giovannini, G., Piccinini, R. 2000. Relationship between teat tissue immune defences and intramammary infections. *Adv Exp Med Biol*, 480: 287-293.
- Zink, M.C., Narayan, O. 1989. Lentivirus-induced interferon inhibits maturation and proliferation of monocytes and restricts the replication of caprine arthritis-encephalitis virus. *J Virol*, 63: 2578-2584.