

## DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS MAEDI VISNA, MEDIANTE ELISA EN SUERO Y LECHE INDIVIDUAL Y DE TANQUE, EN OVINOS LATXA NAVARRA Y COMPARACIÓN DE SEROPREVALENCIA CON RAZA NAVARRA

I. Glaria<sup>1</sup>, R. Reina<sup>1</sup>, I. García<sup>1</sup>, M.I. Mora<sup>1</sup>, L. Luján<sup>2</sup>, J. Badiola<sup>2</sup>, ASLANA<sup>3</sup>, Instituto Lactológico de Lekunberri<sup>4</sup>, ANGRA<sup>5</sup>, ITG ganadero (Sección Patología Ovina)<sup>6</sup>, D. de Andrés<sup>1</sup> y B. Amorena<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales, CSIC-UPNA. Ctra. Mutilva Baja, 31192 Mutilva Baja, Navarra; <sup>2</sup>Departamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza; <sup>3</sup>Prje. Soto s/n, 31170 Iza; <sup>4</sup>Plazaola, 23, 31870 Lekunberri, Navarra; <sup>5</sup>Ctra. De Pastriz, km 3'6, 50194 Movera, Zaragoza; <sup>6</sup>Ctra. El Sadar s/n. Edif. El Sario, 31006 Pamplona, Navarra

### INTRODUCCIÓN

La seroprevalencia del extendido virus Maedi Visna (VMV) se ha venido estudiando por inmunodifusión en gel de agar (AGID) (Ameztoy et al., 1998; Berriatua et al., 2002), y recientemente por técnicas ELISA de nueva generación. Con una de ellas (Innotest MVV) se han estudiado ovinos de algunas zonas españolas y europeas (Saman et al., 1999; Varea et al., 2001; Extramiana et al., 1999; Daltabuit et al., 2002). Los análisis de ELISA en leche o calostro son escasos (Saman et al., 1999; Bandecchi et al., 2000), y no se han comparado estadísticamente los valores ELISA (cociente de absorbancias, según Elitest, MV Diagnostics, Edimburgo, Gran Bretaña) en leche y suero ni determinado el valor diagnóstico del ELISA de tanque en explotaciones lecheras. Así, en este trabajo se ha comparado en ovinos navarros, hasta hoy sólo estudiados en AGID, la prevalencia del VMV por ELISA en sangre y leche, y estudiado la aplicación del ELISA de tanque al diagnóstico en la explotación.

### MATERIAL Y MÉTODOS

**Animales y muestras.** Se utilizaron ovinos de 4 a 5 años, pertenecientes a las razas Latxa Navarra (100 animales, 10 animales por explotación, una muestra pareada de leche y suero por fecha y animal) y Raza Navarra (480 animales, 10 animales por explotación, una muestra de suero por animal).

**Test ELISA.** Se determinó la seroprevalencia al VMV utilizando el test ELISA Innotest MVV (actualmente Elitest, MV Diagnostics, Edimburgo, Gran Bretaña), considerándose valores positivos los cocientes de absorbancias >1.

**PCR.** La presencia de VMV en leucocitos (PBMC) extraídos por flotación (Ficoll-Hypaque, d = 1,077; Lymphoprep Asix-Shield, Oslo) a partir de sangre con EDTA tripotásico se detectó por una PCR semianidada de la región Pol (C. Woodall, Universidad de Edimburgo, comunicación personal; Tolari et al., 2000), puesta a punto por nuestro grupo. Para ello, el DNA (1000 ng) se obtuvo por el sistema QIAamp DNA Blood Midi Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania).

**Análisis estadístico.** Se determinaron el coeficiente de correlación entre los valores ELISA de leche y suero (r), y el grado de concordancia entre los tests ELISA de leche y suero, obtenido este último mediante el estadístico Kappa (Cohen, 1960).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Valores ELISA obtenidos en suero y leche de Latxa Navarra.** Se observaron diferencias ( $p < 0,05$ ) entre las medias de valores ELISA en leche y suero en las 8 ganaderías con varianzas similares ( $p > 0,05$ ) en ambos fluidos, pero existía correlación ( $r = 0,70$ ;  $p < 0,001$ ) entre los valores ELISA individuales de leche y

siero (Tabla 1). Asimismo, se observó una concordancia excelente entre los diagnósticos con ELISA de suero y de leche (Tabla 2), obteniéndose un valor Kappa para límites de confianza de 95%  $K= 85,49 \pm 10,37$  con sólo 7 discrepancias entre las 100 muestras pareadas analizadas. Al estudiar por PCR estas 7 discrepancias (Tabla 3), 4 correspondían a animales PCR positivos, siendo 2 de ellos ELISA positivos en suero y los otros 2 en leche. En conjunto, estas observaciones demuestran que los resultados ELISA de suero y leche, aun pudiendo diferir en algunos casos, se correlacionan y son válidos para determinar la seroprevalencia.

**Tabla 1.** Media de los valores ELISA obtenidos en leche y suero de 10 explotaciones Latxa Navarra

Ganadería	N	Leche	Suero
UNA	10	10,33	8,23
BEU	10	1,00	0,43
LAT	10	0,65	0,76
UHA*	10	6,32	3,46
BIS	10	5,21	4,22
ORB	10	5,48	3,94
AZP	10	1,95	2,35
ORR	10	6,68	6,18
ETX	10	5,91	7,63
GAI*	10	0,03	0,16

\* Varianzas de leche y suero diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 2.** Concordancia entre los resultados ELISA de leche y suero

Leche	Suero		Total
	+	-	
+	37	5	42
-	2	56	58
Total	39	61	100

**Tabla 3.** PCR de la región Pol en PBMC para estudiar los resultados discrepantes entre ELISAs de leche y suero

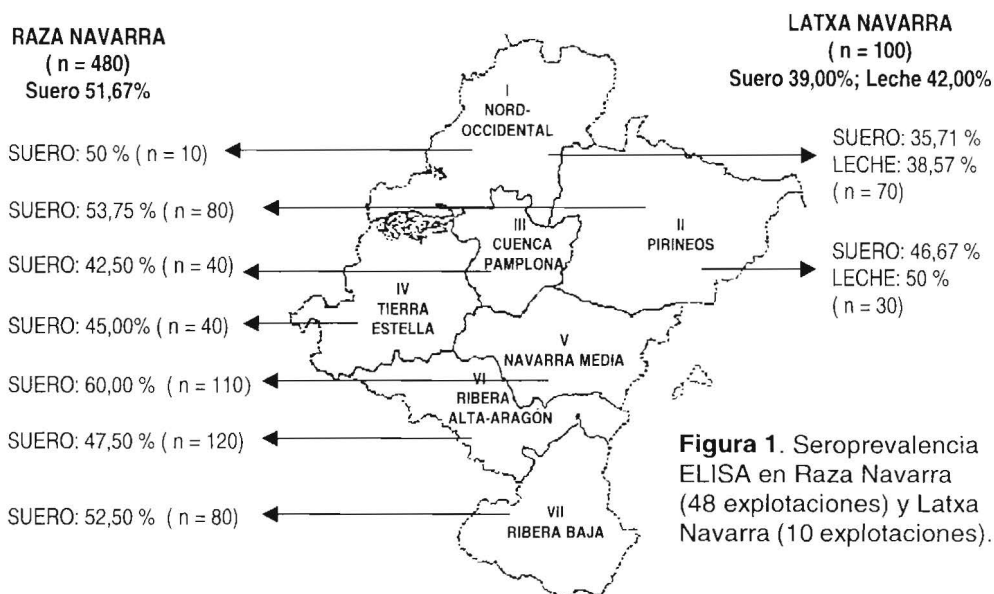
Oveja	Ganadería	Valor ELISA en suero	Valor ELISA en leche	PCR-Pol
A	UNA	0,02 (-)	11,31 (+)	+
B	UNA	0,10 (-)	5,57 (+)	-
C	BEU	0,09 (-)	1,61 (+)	+
D	LAT	2,22 (+)	0,02 (-)	+
E	ORB	0,03 (-)	12,38 (+)	-
F	ORR	0,07 (-)	6,81 (+)	-
G	ORR	13,02 (+)	0,01 (-)	+

**Tabla 4.** Utilidad de ELISA en leche de tanque para la predicción de seroprevalencia en la ganadería

Ganadería	Valor ELISA en leche de tanque	Proporción de ovejas ELISA positivas	Media de valores ELISA individuales
UNA	8,58 (+)	9/10	10,33
BEU	0,61 (-)	2/10	1
LAT	0,8 (-)	2/10	0,65
UHA	8,94 (+)	6/10	6,32
BIS	9,6 (+)	5/10	5,21
ORB	7,9 (+)	5/10	5,48
ORR	6,6 (+)	6/10	6,68
ETX	9,4 (+)	7/10	5,91

**Utilidad del ELISA de leche de tanque.** En 2 ganaderías (BEU, LAT), el valor ELISA en leche de tanque fue unas 10 veces menor que en las 6 restantes, con una media de valores ELISA individuales en ambas  $\leq 1$ , frente a  $> 5$  en las demás (Tabla 4). Ambas ganaderías tenían sólo 2 ovejas seropositivas de las 10 estudiadas, cifra que subió a 5 en las otras 6 ganaderías. Así, el ELISA de leche de tanque podría tener un valor orientativo sobre la seroprevalencia para el VMV en la ganadería.

**Prevalencia ELISA en Latxa Navarra y Raza Navarra.** En ambas razas, la prevalencia encontrada se hallaba entre el 35,71% y el 60,00% (Figura 1). La variabilidad observada de los valores de seroprevalencia (% de animales infectados) entre los 58 rebaños estudiados fue muy acusada, distribuyéndose del siguiente modo: 17 ( $\leq 20\%$ ), 10 (21-40%), 10 (41-60%), 11 (61-80%) y 10 ( $>80\%$ ).



**Figura 1.** Seroprevalencia ELISA en Raza Navarra (48 explotaciones) y Latxa Navarra (10 explotaciones).

## REFERENCIAS

**Ameztoy** et al. (1998). Med Vet 15(1): 28-31; **Cohen** (1960). Educ Psychol Meas, 20: 37-46; **Bandecchi** et al. (2000). Workshop Infectious Diseases, Anno II, SISVet Annual meeting p 67-8; **Berriatua** et al., (2002). XXVII Jornadas SEOC. Valencia. p. 522-528; **Daltabuit** et al., (2002). XXVII Jornadas SEOC. Valencia. p. 543-549; **Extramiana** (1999). Desarrollo y evaluación de nuevas técnicas de diagnóstico del Maedi-Visna. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza; **Saman** et al. (1999). Clin Diagn Lab Immun, 6: 734-40; **Tolari** et al., (2000). International Conference Animal Retroviruses. Vol 1. Queen's College. Cambridge, U.K. p 61; **Varea** et al. (2001). J Vet Diagn Invest 13: 301-7; **Woodall** (comunicación personal).

## AGRADECIMIENTOS

Financiado por: CICYT (AGL2000-1489-C02), INIA (RTA01-107-C3-1) y UE (QLK2-CT-2002-00617 y CRAF-1999-70356). A la Dra S. Hervás-Stubbs por su contribución a la puesta a punto de la PCR de Pol.