COMPARACIÓN DE DISTINTAS VÍAS DE INOCULACIÓN Y DOSIS VÍRICA NECESARIA PARA PROVOCAR LA INFECCIÓN POR MAEDI VISNA EN OVINOS

B. González[1], L. Luján[2], C. Pacheco[3], S. Andrés[1], R. Reina[1], D. De Andrés[1], J.J. Badiola[2], B. Amorena[1].

[1] CSIC-SIA. Avda. Montañana 930, 50016 Zaragoza; e Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales (CSIC-UPNA) 31006 Pamplona
[2] Departamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria. C/Miguel Servet 177. 50016 Zaragoza
[3] Mutual Cyclops. C/ Ausiasmark 41. 08010 Barcelona.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas que aparecen en los estudios de evaluación de la efectividad de las vacunas es determinar qué dosis infectante y qué vía son adecuadas a la hora de realizar la infección experimental en los animales vacunados (challenge). Lo deseable es lograr una infección en un plazo razonable de tiempo, utilizando una vía de fácil acceso pero que no requiera una dosis del microorganismo excesivamente elevada, pues ésta no permitiría detectar de forma apropiada el efecto protector de la vacuna. El objetivo del presente trabajo es determinar la dosis infectante y la vía de inoculación apropiadas al realizar una infección experimental con el virus Maedi Visna (VMV). La información obtenida es de interés en ganado ovino, ya que en el momento actual se están desarrollando y evaluando vacunas frente a VMV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Antes de llevar a cabo la infección experimental in vivo, se tituló el virus sobre cultivos celulares de fibroblastos obtenidos de explantes de piel, con el fin de conocer su infectividad. Para ello, se determinó la dosis infectante que producía la muerte al 50% de las células en los cultivos ($TCID_{50}$) (1).

Se utilizaron 18 ovejas de la raza Rasa Aragonesa, distribuyéndose 6 animales por cada vía de inoculación (intradérmica, intravenosa e intratraqueal). De acuerdo con los protocolos ya descritos (2), se llevó a cabo la inoculación intradérmica e intravenosa. Al realizar la inoculación intratraqueal, se administró un tranquilizante a las ovejas para posteriormente rasurar y desinfectar el cuello a la altura de la tráquea. Manteniendo la cabeza del animal erguida, se buscó el espacio intertraqueal con los dedos y se inoculó el virus (en un volumen de 1 ml), manteniendo la posición erguida de la cabeza durante unos minutos para evitar la tos del animal.

En cada grupo de 6 animales, dos ovejas recibieron una dosis de 20 $TCID_{50}$, dos recibieron una dosis de 200 $TCID_{50}$ y dos recibieron una dosis de 2000 $TCID_{50}$.

Tras la inoculación del VMV, se tomaron muestras de sangre semanalmente a los animales para la realización de las pruebas serológicas de inmunodifusión en gel de agar (AGID) y ELISA. Asimismo, se evaluó la carga vírica en sangre, utilizándose la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite la detección del genoma vírico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según los resultados expuestos en la Tabla 1, en el caso de inoculación intradérmica no se obtuvo ninguna respuesta humoral en ELISA al cabo de 6 meses, por lo que dicha vía

quedó desestimada. Por vía intravenosa, la respuesta humoral apareció sólo en uno de los animales y no antes de 2 meses, tras la inoculación tanto de 2000 $TCID_{50}$ como de 200 $TCID_{50}$. Así, los resultados obtenidos por esta vía eran variables, por lo que la dosis a inocular debería ser de 2000 $TCID_{50}$ o mayor para asegurar la infección, con el consiguiente riesgo de que fuera excesiva y los animales se infectaran antes de poder determinar el efecto de la vacunación. En cuanto a la vía intratraqueal, rápida inductora de respuesta inmunitaria (3), los anticuerpos circulantes aparecieron en sólo 1 semana en el caso de la dosis más alta.

Tabla 1. Comparación por ELISA de la precocidad de seroconversión al realizar la inoculación vírica por distintas vías.

	Dosis	*Período mínimo transcurrido para la aparición de anticuerpos post-inoculación (post-challenge)*
Intradérmica	2000 $TCID_{50}$	> 24 semanas
	200 $TCID_{50}$	> 24 semanas
	20$TCID_{50}$	> 24 semanas
Intravenosa	2000 $TCID_{50}$	8 semanas
	200 $TCID_{50}$	8 semanas
	20$TCID_{50}$	> 24 semanas
Intratraqueal	2000 $TCID_{50}$	1 semana
	200 $TCID_{50}$	2 semanas
	20 $TCID_{50}$	> 8 semanas

Como puede observarse en la Tabla 2, en la que se ilustra la evolución serológica tras la inoculación intratraqueal, se detectaron anticuerpos antes con la técnica ELISA que con el AGID, ya que aquélla es más sensible que esta última (4, 5), obteniéndose una positividad continuada desde el momento en el que el animal seroconvirtió. En lo que respecta a la dosis más adecuada para inocular por vía intratraqueal, ésta podría ser de 200 $TCID_{50}$, dosis a la cual las ovejas presentan anticuerpos circulantes entre las 2 y las 6 semanas tras la inoculación. Dosis mayores (2000 $TCID_{50}$) podrían provocar una aparición de anticuerpos muy rápida, detectable en el test ELISA, pero dichas dosis podrían ser excesivas a la hora de evaluar las vacunas. Dosis menores de 200 $TCID_{50}$ no permitirían la detección de anticuerpos séricos antes de, al menos, 2 meses tras la inoculación.

Tabla 2. Respuesta serológica a lo largo de dos meses obtenida a distintas dosis infectantes ($TCID_{50}$) por vía intratraqueal, según los análisis de precipitación en gel de agar (AGID) y ELISA.

AGID

Dosis ($TCID_{50}$)	Oveja	1 sem. p.i.	2 sem. p.i.	3 sem. p.i.	4 sem. p.i.	5 sem. p.i.	6 sem. p.i.	7 sem. p.i.	8 sem. p.i.
2000	2024	-	-	-	-	-	dudoso	dudoso	dudoso
2000	2044	+	+	+	+	+	+	+	+
200	9012	-	+	+	+	+	+	+	+
200	1060	-	-	-	-	-	-	-	-
20	6918	-	-	-	-	-	-	-	-
20	7830	-	-	-	-	-	-	-	-

ELISA

Dosis ($TCID_{50}$)	Oveja	1 sem. p.i.	2 sem. p.i.	3 sem. p.i.	4 sem. p.i.	5 sem. p.i.	6 sem. p.i.	7 sem. p.i.	8 sem. p.i.
2000	2024	+	+	+	+	+	+	+	+
2000	2044	+	+	+	+	+	+	+	+
200	9012	-	+	+	+	+	+	+	+
200	1060	-	-	-	-	-	+	+	+
20	6918	-	-	-	-	-	-	-	-
20	7830	-	-	-	-	-	-	-	-

En conclusión, estos resultados indican que la precocidad en la aparición de anticuerpos tras la inoculación del VMV es dependiente de la dosis infectante (a mayor dosis mayor precocidad), la vía de inoculación (la intratraqueal es más efectiva que la intravenosa y ésta lo es más que la intradérmica) y de la sensibilidad del test utilizado para determinar la aparición de anticuerpos frente al microorganismo infectante (ELISA es más sensible y detecta seroconversión más precozmente que AGID) (4, 5).

Por tanto, en las condiciones de este experimento, la utilización de la vía intratraqueal con una dosis infectante de 200 $TCID_{50}$, la aplicación un test ELISA para la detección de la respuesta serológica en lugar de AGID y la realización de un ensayo de PCR parecen ser potencialmente válidos para llevar a cabo un challenge con VMV y a la hora de evaluar las respuestas en la inmunización frente a dicho virus.

AGRADECIMIENTOS.- Nuestro especial agradecimiento al personal encargado del manejo y cuidado de los animales del Servicio de Investigación Agraria de Zaragoza (Enrique Morago, Elías Echegoyen, Fidel Lahoz y colaboradores). Financiado por INIA (proyectos y becas sobre inmunización frente a VMV), CICYT (AGL2000-1489-C02-01 y 02) Acción COST 834 de la unión Europea.

REFERENCIAS

1. Tizard, I. (1995), Inmunología Veterinaria.
2. Current Protocols in Immunology (1995) (vol.1).
3. G. Pétursson, S. Matthiasdóttir, A. H. Martin, V. Andrésdóttir, V. Svansson, S. Torsteinsdóttir. Comunicación oral. International Conference and Workshop on Animal Retroviruses. Cambridge, Septiembre 2000.
4. E. Saman, G. Van Eynde, L. Luján, B. Extramiana, G. Harkiss, F. Tolari., L. González, B. Amorena, N. Watt and J. Badiola (1999). Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 6, 734- 740.
4. R. Varea, E. Monleón, C. Pacheco, L. Luján, R. Bolea, A. Vargas, G. Van Eynde, E. Saman, L. Dickson, G. Harkiss, B. Amorena and J. Badiola (2001) (en prensa).