

INFLUENCIA DE ALGUNOS PRESERVATIVOS CONSERVADORES SOBRE LA EFECTIVIDAD DE UNA VACUNA CONTRA LA ENFERMEDAD DEL NEWCASTLE

Dr. Carlos A. Soria.

Pontificia Universidad Católica del Ecuador, y Laboratorios Life, Quito.

El virus **Tortos furens** perteneciente al grupo de los paramixovirus es causante de la enfermedad del Newcastle en las aves de corral. Este mal se caracteriza por la presencia de trastornos respiratorios y nerviosos de curso rápido y de alta mortalidad (1).

El virus objeto de este estudio es pleomórfico, la mayoría de las veces esférico, rodeado de una envoltura compuesta de lípidos y proteínas, de la que se proyectan espículas gluco-proteínicas. Estas glucoproteínas pueden ser de 2 tipos: algunas pueden unirse a los eritrocitos de gallina, haciendo del virus una partícula hemaglutinante; otras poseen actividad neuraminidasa. Por debajo de la envoltura se encuentra la nucleocápsula proteínica helicoidal del virus que protege a una o dos unidades de ácido ribonucleico de una sola cadena (2).

La enfermedad del Newcastle sólo puede ser profilácticamente controlada a través de vacunas, algunas consistentes de cepas avirulentas de virus vivos, capaces de estimular variadas respuestas inmunológicas humoral y celular (3, 4, 5). La cepa lentógena y

avirulenta B1 se ha utilizado en la elaboración de vacunas vivas. La respuesta inmunológica a esta cepa parece ser directamente proporcional a la cantidad de virus vivos que se encuentra en la vacuna utilizada (2).

Varios químicos en concentraciones tales como el lugol (1:100), formalina (2:100), fenol (0,5:100), cresol (2:100), sosa cástica y lechada de cal (3:100) y los detergentes y solventes de lípidos (1), así como ciertos iones como el calcio (2), han probado ser letales para el virus del Newcastle. En estos trabajos no se reportan diferencias en la susceptibilidad entre una cepa y otra. Sólo se ha documentado una marcada reducción en la infectividad viral de la cepa: la Sota expuesta a 11 hasta 22 ug por cm³ de butilhidroxitolueno por 30 min a 37°C, comparada con el efecto de este conservador sobre la cepa Texas-GB, bajo condiciones similares (3).

El presente estudio reporta la influencia sobre la viabilidad del virus del Newcastle cepa B1, expuestos a conservadores como el metil y el propil parabenos, comparados con los

efectos del fenol en un extremo y los de la penicilina y estreptomycinina en el otro extremo, en presencia o ausencia de tampón a base de potasio fosfato.

MATERIALES Y METODOS

Líquido alantoideo (0.1 cm^3) conteniendo virus de Newcastle cepa B1 equivalente a 100 dosis letales 100 (titulado en embrión) fue inoculado en la cavidad alantoidea de embriones de pollo, de 10 días de edad. Dichos embriones infectados fueron incubados a 37°C durante 72 hr para fines de multiplicación viral.

Al término de la incubación y mucho antes de que se observaran efectos letales causados por la infección, se recogió asépticamente el líquido alantoideo conteniendo virus de Newcastle (2). Este líquido fue diluido 1:5 en bufer fosfato azucarado pH 7 para proceder a liofilizar en volúmenes de 1.5 cm^3 . La vacuna así liofilizada tenía vacío y un promedio de 1.8 por 100 de humedad relativa con un error estándar de 0.2.

La vacuna fue reconstruida asépticamente 1:2 en cada una de las siguientes soluciones: 1— Penicilina 450 u y estreptomycinina 1.400 u por cm^3 de agua; 2— solución tampón de potasio 0.01 M con penicilina 450 u y estreptomycinina 1.400 u por cm^3 ; 3— metil parabeno 1.800 ug y propil parabeno 200 ug por cm^3 de agua; 4— fenol 5 mg por cm^3 de agua. Seguidamente, estas preparaciones fueron incubadas a 18°C por 2 hr previo a su utilización.

Cada una de estas preparaciones fue administrada por separado a un grupo

de 25 ambriones (4 grupos en total), a razón de 0.1 cm^3 por individuo, utilizando la cavidad alantoidea como vía de inoculación. Estos embriones fueron incubados a 37°C y ovoscopiados cada 24 hr durante 7 días registrando sus mortalidades.

Otros setenta y dos embriones de 10 días de edad fueron distribuidos en 4 grupos de 18 individuos; cada grupo recibió una preparación de vacuna expuesta a los conservadores en estudio en forma similar a lo descrito anteriormente, siendo seguidamente incubados a 37°C .

Tres individuos de cada uno de estos grupos fueron removidos al tiempo 0 y con intervalos de 24 hr durante 5 días después de la inoculación para obtener asépticamente un pool de líquido alantoideo. Este líquido conteniendo virus, supuestamente en diferentes proporciones dependiendo del grupo, fue sometido a pruebas de hemaglutinación (HA), de acuerdo a la técnica descrita por Cunningham (6), utilizando una suspensión al 0.5 por 100 de hematías de un pollo sin historial de haber sido expuesto al virus de Newcastle.

Cada preparación vacunal de las que se habla fue también administrada a uno de 4 grupos de 5 pollitos de 10 días de nacidos a razón de 0.1 cm^3 por individuo, utilizando la vía ocular. Posterior a la vacunación, dichos animales permanecieron en jaulas apropiadas con libre acceso a comida y agua, por espacio de 21 días, al término de los cuales se sangró del corazón

con una aguja de 18 G, obteniendo un pool de sangre para cada grupo.

De la sangre coagulada se separó el antisuero contra cada una de las vacunas expuestas a los conservadores en estudio, el cual fue clarificado por centrifugación a 160 G. Estas preparaciones sirvieron para los estudios de inhibición de la hemoaglutinación (HI), según técnicas establecidas (6).

RESULTADOS Y DISCUSION

La Tabla I indica los resultados referentes a la mortalidad de embriones inoculados con virus expuestos a los conservadores indicados. Se encontró que los virus en soluciones con penicilina y estreptomycinina con o sin tampón fosfatos, empezaron a causar mortalidad a las 96 hr, siendo las 120 hr el tiempo más crítico, ocasionando la

mayoría de las mortalidades. En contraste se puede observar los resultados con fenol donde la mayoría de las mortalidades ocurrieron a las 144 y a las 168 hr. Casos similares se encontraron con los parabenos, aunque las mortalidades más altas aparecieron a las 120 y 144 hr.

El aumento significativo en el tiempo de mortalidad de aquellos embriones que recibieron virus expuestos a conservadores como el fenol y parabenos, parece indicar una disminución en el número de partículas virales viables, considerando que el tiempo de mortalidad embrional, en las condiciones de estos experimentos, debería estar directamente proporcional al número de partículas infectivas. La mortalidad observada a las 24 hr es atribuida a causas no específicas.

TABLA I. EFECTO DE PARABENOS, FENOL Y FOSFATOS SOBRE LA VIABILIDAD DEL VIRUS DE NEWCASTLE, CEPA B₁

Tiempo de observación (en horas)	Número de embriones muertos (Mediana \pm es) después de inoculados con virus expuestos a			
	Agua Penstrept	Fosfatos Penstrep	Parabenos	Fenol
0	0	0	0	0
24	2 (0.6)	2 (0.3)	2	2 (0.3)
48	0	0	0	0
72	0	0	0	0
96	5 (0.7)	5 (0.3)	2 (0.3)	0
120	17 (0.9)	17 (0.3)	7 (0.9)	2 (0.3)
144	1 (0.6)	1	12 (0.3)	14 (1.5)
168	2 (0.9)	7 (2.0)

PENSTREPT = PENICILINA + ESTREPTOMICINA.

TABLA II. TITULO VIRICO (HA) DEL LIQUIDO ALANTOIDEO (DILUCION 1:10 EN AGUA) DE EMBRIONES INOCULADOS CON VIRUS EXPUESTOS A VARIOS QUIMICOS

Tiempo Post-Inoculación (en horas)	Agua Penstrep	Fosfatos Penstrep	Parabenos	Fenol
0	0	0	0	0
24	0	0	0	0
48	5	0	0	0
72	40	20	20	5
96	640	320	80	80
120	2560	1280	640	320

HA = UNIDADES DE HEMOAGLUTINACION
PENSTREPT = PENICILINA + ESTREPTOMICINA.

Estos resultados guardan estrecha relación con los expresados en la Tabla III que se refiere al título vírico en unidades de hemoaglutinación (HA).

La hemoaglutinación causada por virus fue reportada por primera vez en 1941 por Hirst y por McClelland y Hare. Esta reacción es causada por la unión de las espículas glucoproteínicas de la envoltura del virus con los receptores mucoproteicos en la membrana de los hematíes; por lo tanto, esta propiedad proporciona un método sencillo y rápido para titular virus (7). De modo que el título viral en unidades HA, corresponde al inverso de la última dilución del virus capaz de aglutinar una cantidad constante de eritrocitos (6).

De los resultados se puede apreciar un aumento en el título, esto es, en el número de virus, a medida que aumenta el tiempo de incubación. Sin embargo, se observa un aumento mu-

cho mayor y significativo, en función de tiempo, en embriones inoculados con virus expuestos a penicilina y estreptomycin, en presencia o ausencia de tampón fosfatos. Se nota los títulos bajos en líquido alantoideo con virus expuestos al fenol y también a los parabenos, demostrándose un efecto letal parcial en la población viral, acorde con las condiciones del experimento. Es sabido el efecto desnaturalizador de proteínas y poder detergente del fenol. Con los parabenos, es de esperarse propiedades microbicidas probablemente similares a las del fenol, ya que resultan ser ésteres alquilo del ácido p-hidroxibenzoico o derivado fenólico (8).

Estos resultados se reflejan en los cálculos del título de la inhibición de la hemoaglutinación (HI) expresados en la Tabla III. Sabemos que la cantidad de anticuerpos aumenta proporcionalmente a la cantidad de virus vi-

**TABLA III. INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION (HI):
EFECTO DE VARIOS QUIMICOS EN LA HABILIDAD
DE LA VACUNA PARA ESTIMULAR PRODUCCION
DE ANTICUERPOS**

Título	Agua Penstrep	Fosfato Penstrep	Parabenos	Fenol
Suero	5	5	10	80
HI	160	160	80	10

vo administrado como vacuna, esto es, anticuerpos capaces de inhibir la hemoaglutinación (9). De ahí que los virus tratados previamente con fenol dieron un HI de 10, título que puede ser considerado normal en el suero de las aves no vacunadas (6).

El título HI, en este caso, corresponde al valor que resulta de dividir el título del virus HA de una vacuna diluida con agua destilada (que en este caso resultó ser de 160), para el título del suero que corresponde a la inversa de la dilución del virus en el cual se inhibió completamente la hemoaglutinación. Si a este resultado le multiplicamos por el factor inverso de la dilución del suero, obtenemos el HI. Por lo tanto, mientras más alto sea el valor HI, más anticuerpos contra el virus de Newcastle se encuentran en el suero del animal vacunado, que en estos experimentos, correspondería a los anticuerpos que respondieron a las vacunas reconstituidas en ausencia de fenol o parabenos. Por el contrario, los resultados obtenidos con vacunas expuestas a estos conservadores, demuestran la existencia de daños antigénicos que pueden explicar su incapaci-

dad para estimular una sólida respuesta inmunológica. Estos daños al virus parecen ser menores con los parabenos que con el fenol, probablemente debido a que se utilizó 2.5 veces más fenol que la concentración total de parabenos, esto es si también no se argumenta posibles diferencias en el mecanismo de acción en las circunstancias del experimento.

De ahí la necesidad de utilizar vacunas que garanticen un número adecuado de virus vivos avirulentos y la importancia de protegerlos contra la influencia de medios físicos y químicos que puedan alterar la carga vírica y en consecuencia, minimizar la respuesta inmunológica del huésped.

RESUMEN

La estructura viral puede verse afectada por la presencia de ciertos compuestos químicos. Se demuestra un aumento en el tiempo de mortalidad de embriones de pollo que recibieron virus expuestos a conservadores como el fenol o el metil y el propil parabeno, lo que indica una disminución significativa en el número de partículas

virales viables capaces de causar infección.

Por hemoaglutinación también se demuestra un incremento relativamente pequeño y lento en el número de virus, en función de un tiempo determinado, en el líquido alaitoideo de embriones inoculados con virus expuestos a fenol y parabenos, a diferencia de otros embriones que recibieron vacunas expuestas a conservadores como la penicilina y estreptomycin con o sin tampón fosfato.

El uso de vacunas tratadas con fenol o parabenos, previo a su administración en pollitos, dieron títulos serológicos de inhibición de la hemoaglutinación bastante bajos, demostrando también la importancia del uso adecuado de conservadores apropiados en una formulación vacunal.

S U M M A R Y

A viral structure may be affected by the presence of certain chemical compounds. The present study demonstrates an increase in the time of mortality of chicken embryos inoculated with virus previously exposed to phenol or methyl and propylparabens, which indicates a significant decrease in the number of viral particles capable of causing infection.

In a certain time period of infection, it is also demonstrated through hemagglutination, a relative small increase in the number of virus in the allantoic fluid of embryos infected with virus treated with phenol or parabens. This is in contrast with the vi-

ral increase in embryos exposed to vaccines containing penicillin and streptomycin with or without buffer phosphate.

Same vaccines exposed to phenol or parabens previous application to young chickens, gave low hemagglutination inhibition serological titers which also indicates the importance of an adequate alive viral vaccine formulation.

LITERATURA CITADA

1. Jover, F. P. 1968. Enfermedades y parásitos de las aves domésticas. pg. 310-331, segunda Ed. Ministerio de Agricultura, Madrid.
2. Allan, U. H., Lancaster, J. E., Toth, B. 1980. Colección FAO, N° 10. pg. 1-178. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.
3. Brugh, Jr. M. 1977. Butylated Hydroxytoluene protects chickens exposed to Newcastle disease virus. *Science*, 197, 1291-1292.
4. Morita, C., Okada, T., Izawa, H., Soekawa, M. 1976. Agarose droplet method of macrophage migration - inhibition test for Newcastle disease virus in chickens. *Avian Diseases*, 20, 230-235.
5. Beard, C. W., Brugh, Jr. M. 1975. Immunity to Newcastle disease. *Am. J. Vet. Res.* 36, 509-512.
6. Cunningham, C. H. 1959. *Virología práctica*. pg. 97-104. Edit. Acribia, Zaragoza.
7. Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Gingsberg, H. S., Wood, Jr. W. B., McCarty, M. 1979. *Tratado de Microbiología*, pg. 1056-1059. Edit. Salvat, Barcelona.
8. *The Merck Index* 1976, pg. 796, 940, 1018. Merck and Co., Rahway, N. J. USA.
9. Schloer, G., Spalatin, J., Habil, D. M. V., Hanson, R. P. 1975. Newcastle disease virus antigens and strain variations. *Am. J. Vet. Res.* 36, 505-508.