

“RELACIONES ANTIGENICAS ENTRE CUATRO CEPAS DE VIRUS DE NEWCASTLE”

A. A. SCHUDEL *, G. A. OLIVA **, M. E. ETCHEVERRIGARAY ***
y J. E. ZABALA ****

R E S U M E N

Se produjeron antisueros específicos contra cuatro cepas de virus de Newcastle, dos vaccinales y dos patógenas. Una de ellas prototipo del último brote de la enfermedad en nuestro país. Se realizaron réplicas de pruebas de HI cruzadas empleando para el análisis de los resultados el valor $\frac{1}{T} \geq 2,8$, análisis de varianza e intervalos de confianza de las medias. Por estos métodos no pudieron establecerse diferencias de significación ($p=0,10$) entre cepas o entre sueros.

Se observaron diferencias en los títulos obtenidos con un mismo suero frente a diferentes antígenos, que aunque no alcanzan niveles de significación, pueden inducir a errores interpretativos.

Por inmunodifusión es posible identificar un componente común a todas las cepas patógenas y vaccinales y un segundo componente propio de las cepas vaccinales, no caracterizado.

S U M M A R Y

“ANTIGENIC RELATIONSHIP BETWEEN FOUR DIFFERENT NVD STRAINS”

Antiserum against two vaccine and two pathogenic NVD strains were produced. One of the pathogenic strains was FCV-2620 Prototype of the last epizootic in Argentina.

The 16 serum-antigen combinations were assayed by cross HI and immunodiffusion. The results obtained by HI show no significant differences between antigen or antiserum by $\frac{1}{T} \geq 2,8$ or comparing medium values. But differences in titles between antigens and antisera were shown.

By immunodiffusion we were able to demonstrate one common constituent for all strains and a second, non characterized, for vaccines strains only.

* Miembro de la Carrera de Investigador del CONICET. Jefe de Trabajos Prácticos. Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

** Auxiliar Diplomado, Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

*** Profesor Adjunto a cargo de la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

**** Licenciado en Cálculo estadístico. Jefe de Estadística. Dirección de Ganadería.

I N T R O D U C C I O N

Las diferentes cepas de virus de Newcastle poseen marcadores propios que permiten identificarlas, sin embargo no existe en la literatura dato alguno sobre el establecimiento de diferencias antigénicas entre ellas.

Varios autores han tratado de determinar por diferentes métodos la existencia de variables antigénicas entre cepas de virus de Newcastle. Brandley (1) empleando pruebas de seroprotección cruzada no pudo establecer diferencias entre varias cepas. Bankowski (2) intentó diferenciar cuatro cepas por seroneutralización sobre cultivos celulares con resultados negativos. También se utilizó el tiempo de elución (3) pero con resultados contradictorios.

La persistencia de la última epizootia de Newcastle en nuestro país nos indujo a pensar en la existencia de alguna variación en la cepa actuante, ya que ejercía su poder patógeno aún frente a aves vacunadas o convalecientes de un pasaje anterior del mismo virus en el plantel. Nuestro método experimental trató de establecer diferencias antigénicas entre la cepa prototipo de esa epizootia y las vacinales de uso común por la determinación de anticuerpos hemoaglutinantes y precipitantes, aplicando criterios de disimilitud antigénica semejantes a los utilizados para la clasificación de cepas de influenza (4).

MATERIAL Y METODOS

Huevos embrionados: de 8-9 días, inoculados en cavidad alantoidea con 0,1 ml. de la dilución viral correspondiente. Se incuban a 37°C. y se colectan los líquidos alantoideo-amniótico a las 48 hs. post-inoculación. Se fraccionan y guardan a 20 grados centígrados.

Virus: Dos cepas vacinales B1 y La Sota denominadas 71 y 85, respectivamente, y dos cepas patógenas FCV-2620 prototipo del brote e Italiana o E-TE denominadas 80 y 82. conservadas como líquido alantoideo-amniótico a 20°C.

Preparación de antígenos: para hemoaglutinación o inhibición de la hemoaglutinación (HI) se utiliza líquido alantoideo diluido. Para inmunodifusión se realiza una clarificación del líquido alantoideo por centrifugación a 1.500 rpm, 10' a 4°C, tomando el sobrenadante y concentrándolo por ultracentrifugación en

Beckman L-65, con rotor 30 a 22.000 rpm. 1 hs. a 4°C, resuspendiendo el pellet obtenido en PBS a una concentración 100 veces menor que la original.

Para la preparación de antígenos inactivados, se utiliza líquido alantoideo de cada una de las cepas inactivado con Beta-propiolactona 0,01 por ciento, dejando en estufa a 37°C durante 24 hs. Se probó la inactivación por inoculación en huevo embrionado.

Inoculación experimental para producción de inmunosueros: Se inoculan pollos de cuatro semanas de vida. sin anticuerpos y mantenidos en aislamiento. Al término del período de inoculación se efectuó la extracción de sangre por punción cardíaca, extrayendo luego el suero e inactivándolo a 56°C 30', guardando luego en forma de pool por cepa a -20°C.

PLAN DE INOCULACION PARA CADA CEPA

DIA	TIPO	DOSIS	VIA
1	V. Muerto	0,2 ml.	IM
7	V. Muerto	0,2 ml.	IM
14	V. Muerto	0,2 ml.	IM
21	V. Muerto	0,2 ml.	IM
28	V. Vivo	gota	I. Nasal
40	Extracción	—	—

Hemoaglutinación: Con el método de virus constante, suero variable. Ajustando el virus a 4 UHA por cepa. Glóbulos rojos de ave. Temperatura a 20°C y lectura a los 60'. Microtiter Ing. Co. (Cooke Ing. Co.).

Análisis Estadístico: Se tomaron las medias geométricas y aritméticas.

Se calcularon los valores $\frac{1}{r}$ según

Archetti y Horsfall (4), donde

$$r = r_1 \times r_2$$

$$r_1 = \frac{\text{Título HI suero 1 con virus 2}}{\text{Título HI suero 1 con virus 1}}$$

$$r_2 = \frac{\text{Título HI suero 2 con virus 1}}{\text{Título HI suero 2 con virus 2}}$$

Para la determinación de $\frac{1}{r}$ se trabajó con las medias geométricas. Se aplicó el análisis de Varianza, construyendo una distribución en tabla de doble entrada de 4 x 4 con antígenos y sueros. Por cada complejo suero-virus se calcularon los intervalos de confianza de la media con $p = 0,05$ a fin de realizar la comparación entre complejos (pares). Además se calcularon los respectivos coeficientes de variación.

Inmunodifusión: Sobre portaobjeto, con agar 1,2 %, C1Na 8 % y Buffer de fosfatos pH 7,2. Seis orificios periféricos y uno central separados por 3 mm. de distancia. La lectura se realizó a las 48 horas post-siembra (5) y (6).

RESULTADOS

Se realizaron dos ensayos para la producción de sueros inmunes contra cada una de las cepas virales, inoculando virus inactivado con Beta-propiolactona primero y virus vivo después, según el plan ya descrito. Los sueros así obtenidos en la Experiencia N° 1 y N° 2 se utilizaron para el estudio antigénico por pruebas de HI y los de Experiencia N° 2 para inmunodifusión.

Inhibición de la Hemoaglutinación (HI)

Por la combinación de los cuatro antígenos usados 71-80-82-85 y sus respectivos antisueros se obtienen 16

combinaciones posibles de complejos antígeno-antisuero, realizándose ocho réplicas de cada una de las combinaciones en la Experiencia N° 1, y 12 en la Experiencia N° 2. Tomando luego la media obtenida para cada una de ellas. Los resultados de la determinación del valor $\frac{1}{r}$, análisis de Varianza e intervalos de confianza de los valores medios se detallan en las tablas números 1, 2, 3 y 4.

Inmunodifusión

Se observan dos líneas de precipitación identificables con compues-

tos antigénicos virales, cualquiera sea el antisuero utilizado.

La primera densa y producida en la zona media de precipitación, común a todas las cepas. La segunda más fina, de aparición rápida loca-

lizada entre la anterior y el orificio antigénico, presente sólo en las cepas vaccinales 71 y 85, pero obtenida también en presencia de los antisueros 80 y 82

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los títulos obtenidos por HI demuestran la existencia de variaciones en la capacidad reaccionante de un mismo suero frente a diferentes cepas de virus de Newcastle.

Sin embargo, la determinación del valor $\frac{1}{r}$ con el mismo criterio que para influenza (5) no permite establecer diferencias en la capacidad inhibidora de la hemoaglutinación de un mismo suero frente a cepas virales diferentes, pues no se arriba al valor $\frac{1}{r} \geq 2,8$ considerado por los autores ya mencionados (5) como significativamente diferentes. Sólo en la Experiencia N° 1 se alcanza el valor 2,8 por combinación de las cepas patógenas 80 y 82, pero dicho resultado no se repite en la Experiencia N° 2 por lo que no podemos considerarlo como conclusivo. Sin embargo podríamos intentar explicar este resultado bien por la existencia de alguna anomalía en la producción de los sueros inmunes o bien la existencia de inhibidores inespecíficos de la Hemoaglutinación en esos sueros.

El análisis de Varianza no acusa diferencias significativas con un nivel $p = 0,10$ ni entre sueros ni entre antígenos para ninguna de las dos experiencias. El gran tamaño del error experimental (residual) demostraría una gran variabilidad biológica o imprecisión en el método empleado, que redundaría en una marcada falta de sensibilidad para detectar diferencias entre sueros o entre antígenos.

Es interesante observar en el Gráfico N° 4 la comparación de los intervalos de confianza de los valores medios, donde si bien en casi todos

se aceptan, hay casos como el de las combinaciones del suero 71 con diferentes antígenos en la Experiencia N° 1, en que las diferencias son superiores a cuatro logaritmos de base 2 dependiendo del antígeno usado para testarlo. Este resultado debe llamarnos a la reflexión con respecto a las diferencias que se establecen al titular sueros con diferentes cepas e indicar un determinado nivel de protección.

La presencia de un antígeno común a todas las cepas por inmunodifusión, concordante con los resultados de Waschendorfer (7), y una segunda línea para las cepas vaccinales solamente podría indicar una cierta diferencia antigénica entre cepas, pero creemos que representa un producto de degradación viral, debido al método de preparación antigénica para inmunodifusión. Por otra parte los sueros anti cepas patógenas también reconocen esta segunda línea en los antígenos vaccinales, lo que nos indicaría una diferencia de tipo cuantitativo más que cualitativa.

Estos resultados y los de otros (1-2-3) nos llevan a concluir que por los métodos empleados hasta hoy no es posible demostrar diferencias antigénicas entre cepas de Newcastle, si es que estas diferencias existen.

No puede por tanto atribuirse a variaciones antigénicas, la presencia y prevalencia del brote de Enfermedad de Newcastle durante tan largo tiempo, sino más bien a las características de gran patogenicidad de la cepa actuante o al deficiente estado sanitario de los planteles.

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. A. Vilches por su dirección. A Arbor Acres Argentina por el suministro de huevos embrionados y pollitos BB.

BIBLIOGRAFIA

1. BRANDLEY, C. A.; MOSSES, H. E.; JUNGHERR, E. L. and JONES, E.: "The isolation and identification of NDV". *Amm. Journal Veterinary Research*, 7, 289-306, 1946.
2. BANKOWSKI, R. A.; KINJO, J.: "Tissue culture systems with NDV and relationship of antigenicity to immunogenicity among strains". *Avian Disease*, Vol. IX, Nº 1, 156-170, 1965.
3. SPALATIN, J.; HANSON, R. and BEARD, P.: "The hemoagglutination elution pattern as a marker in characterizing NDV". *Avian Disease*, Vol. XIV, Nº 3, 543-549, 1970.
4. ARCHETTI, I. and HOSFALL, F.: "Persistent antigenic variation of influenza A virus after incomplete neutralization in ovo with heterologous immunoserum". *J. Exptl. Medicine*, 92, 441-448, 1950.
5. BENGLESORFF, H. J. and JAEGER O.: *Zentralbl. F. Bact. Para. Inf. Hyg.* 196, i, 1965.
6. WOERNLE, H.: "Agar gel diffusion Technique in the identification of certain Avian Viral Diseases". *The Veterinarian*, Vol. 4, 17-28, Pergamon Press. 1966.
7. WACHENDORFER, VON G.: "Präzipitinogen und präzipitierende Antikörper bei der Newcastle-Krankheit". *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 72, 176-179, 1965.

TABLA Nº 1: Resultados de Experiencia Nº 1

S	71	80	82	85
V				
71	1	—	—	—
80	1,6	1	—	—
82	1,2	2,82	1	—
85	0,6	1,2	2,6	1

S = Antisueros específicos, V = Antígeno viral

$$\frac{1}{r} ; r = 1; r 72,8 \text{ a } 70,3$$

TABLA Nº 2: Resultados Experiencia Nº 2

S	71	80	82	85
V				
71	1			
80	1,7	1		
82	0,5	0,5	1	
85	0,6	1,4	0,6	1

S = Antisueros específicos, V = Antígenos virales

$$\frac{1}{r} ; r = 1; r 72,8 \text{ a } 70,3$$

TABLA N° 3: Resultados de Análisis de Varianza y corrección de la media, Experiencia N° 1

Fuente de Variación F. V.	Suma de Cuadrados S. C.	Grados de Libertad	Cuadrado Medio C. M.	F. (Snedecor)
Entre Antígeno	254,06	3	84,69	(P = 0,10) 0,45 N. S.
Entre sueros	369,91	3	123,30	(P = 0,10) 0,65 N. S.
Error residual	1711,99	9	190,22	
Totales	2335,96	15		

$S = 37,06$	Corrección de la media = $\frac{3706^2}{16} = 858.402$															
$\emptyset = 15 \text{ (STC)} = 1.859.924 - 858.402 =$	<table border="1"> <thead> <tr> <th>S. C.</th> <th>C. M.</th> <th>F.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1.001.522</td> <td>—</td> <td>—</td> </tr> <tr> <td>82.025</td> <td>27.342</td> <td>0,33 N. S.</td> </tr> <tr> <td>176.944</td> <td>58.981</td> <td>0,71 N. S.</td> </tr> <tr> <td>742.553</td> <td>82.506</td> <td>—</td> </tr> </tbody> </table>	S. C.	C. M.	F.	1.001.522	—	—	82.025	27.342	0,33 N. S.	176.944	58.981	0,71 N. S.	742.553	82.506	—
S. C.	C. M.	F.														
1.001.522	—	—														
82.025	27.342	0,33 N. S.														
176.944	58.981	0,71 N. S.														
742.553	82.506	—														
$\emptyset = 3 \text{ (SC)}_F = 940.427 - 858.402 =$																
$\emptyset = 3 \text{ (SC)}_C = 1.035.346 - 858.402 =$																
$\emptyset = 9 \text{ (SC)}_R = 1.001.522 - 82.025 - 176.944 =$																

TABLA Nº 4: Intervalos confidenciales de las medias de Experiencia Nº 1 y Nº 2

S	V	EXPERIENCIA Nº 1		EXPERIENCIA Nº 2	
		Media	Límites de Con- fianza — $\alpha = 0,05$	Media	Límites de Con- fianza — $\alpha = 0,05$
71	71	320	144 — 496	448	140 — 756
	80	80	36 — 128	229	200 — 398
	82	56	34 — 78	683	431 — 935
	85	1.024	————	2048	————
80	71	384	180 — 588	235	187 — 283
	80	256	————	427	302 — 552
	82	160	72 — 248	512	————
	85	192	90 — 294	256	————
82	71	224	136 — 312	256	————
	80	128	————	384	250 — 518
	82	640	287 — 993	107	33 — 181
	85	64	————	224	136 — 312
85	71	64	————	32	————
	80	—	————	43	28 — 58
	82	96	45 — 147	64	————
	85	64	————	54	41 — 67

S = Antisueros específicos; V = Antígenos virales