

## Comparación entre dos cepas de virus de la enfermedad de Newcastle aisladas en Argentina \*

POR

J. J. MONTEVERDE \*\*, D. H. SIMEONE \*\*\* y E. J. CHIALVO \*\*\*\*

En un trabajo anterior <sup>(1)</sup> hemos informado acerca de algunas de las características del virus de la enfermedad de Newcastle (cepa Quilmes), que por primera vez fuera aislado en la República Argentina a partir de casos naturales de dicha enfermedad, ocurrida en la Provincia de Buenos Aires, en las cercanías de la Capital Federal.

Dado que desde entonces no se ha tenido conocimiento de que se hayan publicado en nuestro medio trabajos experimentales que informen sobre características de cepas de virus de la enfermedad de Newcastle que posteriormente hayan podido aislarse en el país, entendemos que es de importancia investigar y dar a conocer resultados sobre las cepas que están actuando en la República Argentina.

Por referencias verbales (X) sabemos que una cepa de virus aislada en la localidad de Ranelagh, mientras persistía el brote que afectara la zona de donde se obtuvo la cepa Quilmes, presenta algunos atributos que la asemejan a la cepa Quilmes, relacionados con su actividad patogénica.

Después de demostrada en julio de 1961 <sup>(1)</sup> la existencia de la enfermedad de Newcastle en el país, y tal como había sido previsto <sup>(2)</sup> la

- (\*) Trabajo cumplido en la Cátedra de Microbiología (Escuela de Veterinaria). Fac. Agr. y Vet. Bs. As. Comunicado en la reunión científica del 27 de junio de 1962 en la Asociación Argentina de Microbiología.
- (\*\*) Profesor Titular de la Cátedra de Microbiología (Escuela de Veterinaria) y Director de Investigaciones del Centro de Enterobacterias. Facultad de Agr. y Vet. Univer. Buenos Aires.
- (\*\*\*) Profesor Asociado de la misma Cátedra y perteneciente al cuerpo de investigadores del mismo Centro.
- (\*\*\*\*) Auxiliar técnica del Centro de Enterobacterias.
- (X) Comunicación personal del Dr. A. L. Durlach.

misma fue diagnosticada, en sitios alejados del foco inicial: Mar del Plata, Río Cuarto (Córdoba), San Juan y Mendoza. Aparentemente la ciudad de Córdoba y sus alrededores se mantenía indemne, hasta que fuimos consultados (x) y se nos solicitó el envío de suero antinewcastle para afianzar un diagnóstico sobre una cepa de virus, que fuera aislada de un caso clínico sospechoso de enfermedad de Newcastle, en la ciudad de Córdoba; posteriormente (xx) se nos hizo saber que el virus aislado reaccionaba con el suero remitido. El autor del hallazgo nos hizo entrega de la cepa que aislara en Córdoba para estudiarla comparativamente con la cepa Quilmes.

### *MATERIALES Y METODOS.*

Virus: La cepa Quilmes correspondía a 10<sup>9</sup> pasaje por embrión de pollo; la cepa Córdoba correspondía a 6<sup>9</sup> pasaje por embrión de pollo.

Temperatura de conservación: —18°C.

Sueros: Se utilizaron sueros de la colección existente en la Cátedra, procedentes de aves enfermas o recuperadas de la enfermedad de Newcastle.

Hematíes: La sangre obtenida de los animales que se mencionan en las pruebas AH fue tratada con anticoagulante y los hematíes fueron lavados siguiendo el proceder ya detallado en una publicación anterior <sup>(1)</sup>.

Prueba AH: La prueba de aglutinación de hematíes fue conducida según método descrito en una publicación anterior <sup>(1)</sup>.

Prueba IA: La prueba de inhibición de la aglutinación de hematíes se cumplió según los lineamientos dados anteriormente (Procedimiento Beta) <sup>(1)</sup>.

Embrión de pollo: Se utilizaron embriones de pollo de 9 días de edad.

Efecto citopatogénico: Se emplearon cultivos de células HeLa en forma similar a lo señalado en un trabajo anterior <sup>(1)</sup>.

Histopatología: Los estudios histopatológicos fueron cumplidos con la participación de la Cátedra de Anatomía y Fisiología Patológica de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires, a cargo del Prof. Dr. B. L. Morán. Acerca de este punto, está en preparación el

(x) y (xx) Comunicaciones personales del Dr. C. M. Bettinotti del 7 de noviembre de 1961 y del 27 de enero de 1962, informando sobre el aislamiento del virus en Córdoba.

Después de que el presente trabajo se había comunicado y redactado para su publicación, en el II<sup>o</sup> Congreso Argentino de las Industrias de Granja realizado en Buenos Aires, entre el 16 y 21 de julio de 1962, el Dr. J. M. Grillo informó también de un estudio cumplido con sus colaboradores sobre dos cepas de virus de la enfermedad de Newcastle aisladas en la República Argentina.

trabajo, que se comunicará, en el que se darán detalles de métodos y técnicas, como así también resultados de la actividad viral en pollos enfermos natural y experimentalmente, embriones de pollo y células HeLa (cepa Córdoba y Quilmes).

**Viremia:** En las pruebas se emplearon pollos de 8 semanas de edad, sin antecedentes de haber tenido la enfermedad o de haber sido vacunados, por lo menos 15 días antes de su empleo. Se investigó sin embargo el título IA frente al virus de la enfermedad de Newcastle (VEN) y sólo se usaron animales negativos a esta prueba. La dosis empleada para determinar viremia fue 0,1 ml por vía endovenosa, de líquido alantoideo sin diluir, procedente de embriones de pollo inoculados por vía intraalantoidea cuyos títulos fueron: cepa Córdoba y cepa Quilmes = DI 50 %:  $10^{-7,5}$  y  $10^{-8,5}$  respectivamente. A las 24, 48 y 72 horas se aplicó el VEN, se retiró con las precauciones de esterilidad habituales, sangre de estos animales. En cada oportunidad y por cada caso se inoculó por vía intraalantoidea, 0,1 ml de la sangre a no menos de 3 embriones de pollo de 9 días. Todo embrión inoculado fue revisado en el ovoscopio cada 24 horas, los muertos luego de 24 horas de incubación fueron descartados, en cambio aquellos que murieron en lapsos mayores y su líquido alantoideo demostró valores AH positivos a hemáties lavados de pollo, presentaron o no contaminaciones bacterianas en los controles aero-anaeróbicos, fueron considerados infectados con virus activo, procedente de la sangre del pollo de 8 meses de donde se extrajo y a este hecho se asignó: viremia positiva. Los embriones inoculados con sangre que después de 4 a 5 días mantenían su vitalidad, fueron sacrificados y de su líquido alantoideo se hizo prueba AH. La supervivencia de los inoculados en las condiciones expresadas y un valor AH  $> 1:8$  se asignó como: viremia negativa.

**Ratón lactante:** Se utilizaron ratones lactantes de la línea Rockland los cuales fueron inoculados siguiendo los lineamientos consignados en un trabajo anterior <sup>(1)</sup>.

**Suero-neutralización:** Las pruebas se condujeron empleando separadamente suero antinewcastle de pollos recuperados de la cepa Quilmes y de la cepa Córdoba. Cada uno de estos sueros se utilizó diluido 1:5 con suero fisiológico frente a diluciones de los respectivos virus desde  $10^{-5}$  a  $10^{-7}$  (líquidos alantoideos infectados con VEN cepas Córdoba y Quilmes, DL 50 e.p.  $10^{-7,5}$  y  $10^{-8,5}$  respectivamente. Luego del contacto "in vitro" de las mezclas suero-virus, según se ha consignado en un trabajo anterior <sup>(1)</sup>, estas fueron inoculadas a conjuntos de embriones

del pollo de 9 días, por vía intraalantoidea, manteniendo los controles correspondientes de virus y sueros.

*Resultados obtenidos:*

Al compararse la actividad aglutinante de hematíes (AH) de distintas especies de mamíferos entre las cepas Córdoba y Quilmes, se obtuvieron los resultados que se sintetizan en el cuadro N° 1 que va a continuación.

En el cuadro N° 1 es posible apreciar la similitud de resultados obtenidos entre las cepas Córdoba y Quilmes. En el aspecto cuantitativo las diferencias halladas en el título AH para los glóbulos de ratón (32 para cepa Córdoba y 512 para cepa Quilmes) merecen nuevas pruebas; para este tipo de glóbulos la sedimentación de hematíes no fue adecuada después de 2 horas de temperatura ambiente. Los eritrocitos de conejo fueron ensayados, aún cuando no figuran en el cuadro por su inapropiada sedimentación durante las pruebas.

En ningún caso se produjo la aglutinación de hematíes de gato o de caballo, en cambio fueron aglutinados los glóbulos rojos de bovinos. Esto permite diferenciar a estas dos cepas de otras del virus de la enfermedad de Newcastle, destacándose que la aglutinación de hematíes o no, es un carácter considerado como de los más apropiados para distinguir cepas de virus de esta enfermedad ya sea en el aspecto cuali como cuantitativo.

Las cepas Córdoba y Quilmes se comportan, en cuanto a su actividad sobre hematíes de pollo, hombre, perro, cobayo y ratón, como las cepas Herts, Vic, Heb, Las, Twiss, Mass, Cal y Bl (3).

No hemos observado aparición de hemólisis en las cepas estudiadas en este trabajo.

En cuanto a la actividad frente a hematíes de equino y bovino, podemos agregar que las cepas Córdoba y Quilmes se comportan como la cepa lentogénica Bl y mesogénica Roakin (ambas utilizadas en la producción de vacunas) y se diferencian de las cepas La Sota, F, Mass, MK107, NY-Jones, velogénica Texas GB, Mo 31747, Cal. R.O. y Kansas M. I (4).

Con respecto al cuadro N° 2, se puede señalar que por la actividad sobre el embrión de pollo, tanto las cepas Córdoba y Quilmes mantienen características agresivas a pesar de los pasajes operados sobre el embrión de pollo. Como ocurre con las cepas velogénicas la muerte de los embriones se produce alrededor del 2º día, sin embargo no se aprecian placas o manchas en la membrana corioalantoidea.

En cuanto al poder patógeno natural, nuestra experiencia con el VEN (cepa Quilmes) nos obliga a ser cuidadosos. Antes de sufrir repetidos pasajes por embrión de pollo, en donde aparentemente su poder agresor para pollos era mantenido, esta cepa (3er. pasaje por embrión de pollo) al titularla sobre pollos New Hampshire de 30 días de edad <sup>(1)</sup>, empleando la ruta intramuscular tenía una DL 50 % =  $10^{-7,5}$  y por ruta intracerebral actividad aún en diluciones  $10^{-9}$ .

A medida que aumentaban los pasajes por la cavidad alantoidea de embriones de pollo, los valores obtenidos en la titulación (vías subcutánea, intracerebral y oral) sobre pollos de la misma edad (6<sup>o</sup> a 10<sup>o</sup> pasaje) eran diferentes ya que se había producido atenuación.

Tenemos así que al repetir la titulación con la misma cepa, los valores obtenidos cambian y aún no es posible producir muerte. Debemos también advertir que la edad, raza y antecedentes de los animales utilizados deben también ser especialmente considerados, así por ejemplo, notamos que a medida que es mayor la edad de las aves susceptibles aumenta su resistencia a sobrevivir por la agresión de la cepa Quilmes o también que la raza New Hampshire es más sensible que la raza Leghorn.

En los ensayos cumplidos sobre viremia empleamos pollos de 8 semanas de edad, utilizando la vía endovenosa. Luego de inocular respetables cantidades de virus activo tanto de la cepa Quilmes como de la cepa Córdoba, ambas con varios pasajes por embrión de pollo, ninguno de los pollos inoculados murió. También corresponde señalar, con el objeto de mostrar el parecido comportamiento de ambas cepas, que cuando con ellas se inocularon pollos susceptibles de 8 semanas, con elevadas concentraciones de virus ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ), éstas fueron toleradas, sin aparición de síntomas, en cambio los inoculados con diluciones  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$  presentaron síntomas nerviosos leves, sin mortalidad, en aproximadamente el 20 % de los inoculados.

Con referencia a: efecto citopatogénico, viremia en pollos de 8 semanas susceptibles, viremia en pollos vacunados con virus inactivado o recobrados de la enfermedad producida por cada una de las cepas de virus en prueba, o la suero neutralización, no ha sido posible anotar diferencias.

La sensibilidad en la prueba de IA, en forma cruzada, tampoco ha permitido señalar diferencias importantes. Con respecto a la misma, en un trabajo previo <sup>(1)</sup> dimos a conocer algunas diferencias, aparentemente debidas a la sensibilidad de los antígenos utilizados, cuando la cepa Quilmes fue cotejada con la cepa Mayol (origen chileno) y

con La Sota, Luso y 69 (origen brasileño), frente a distintos sueros antinewcastle; entonces se vió que 2 sueros de procedencia argentina daban títulos homólogos de 640 y en cambio frente a la cepa chilena los mismos antisueros daban 1280 y 2560 y a su vez el suero anti de origen chileno con la cepa homóloga daba 1280 y sólo 320 con la cepa Quilmes. Por otra parte con un suero antinewcastle de origen brasileño, la cepa Quilmes dió título 10240, La Sota: 2560; Luso: 640 y 69: 2560; a su vez utilizando suero antinewcastle de origen argentino los títulos obtenidos fueron cepa Quilmes: 1280; La Sota: 320; Luso: 640 y 69: 1280.

#### *RESUMEN Y CONCLUSIONES:*

Se presentan los resultados obtenidos al comparar las cepas Córdoba y Quilmes del virus de la enfermedad de Newcastle, ambas aisladas de animales naturalmente enfermos en la República Argentina en focos alejados entre sí por alrededor de 700 Km.

Se hicieron pruebas de aglutinación de hematíes de pollo, perro, cabra, vaca, cobayo, caballo, gato, oveja, ratón y humano; efecto sobre embriones de pollo (lesiones micro y macroscópicas, DL 50 % y DI 50 % en líquido alantoideo); efecto citopatogénico en células HeLa, actividad infecciosa experimental en pollos de 8 semanas (viremia), actividad sobre pollos inmunizados y recobrados de la infección natural (viremia), actividad sobre ratones lactantes, pruebas de neutralización y de inhibición de la aglutinación de hematíes de pollo (método Beta).

Mediante estas pruebas no fue posible establecer características como para asignar diferencias entre las cepas en estudio.

#### SUMMARY

The results of the comparison of two strains of Newcastle Disease Virus (NDV) recovered from two different outbreaks (700 Km apart) are presented; the strains were named Quilmes and Córdoba.

The study was made through the following tests: hemagglutination of chicken, dog, goat, cow, guinea pig, horse, cat, sheep, mouse and human red cells; pathological changes in chick embryos and 50 % LD; cytopathogenic effects on HeLa cells; viraemia in 8 week old chickens and in both artificially immunized and recovered chicks; activity on unweaned mice, neutralization test and inhibition of the hemagglutination.

The test failed to show any differences worth of mention.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) MONTEVERDE, J. J.; SIMEONE, D. H.; RODRÍGUEZ LEIVA, M. y CHIALVO, E. J.: *Enfermedad de Newcastle. Su hallazgo en la República Argentina*. Rev. Med. Vet. Bs. As., 42, 6 (1961) 3-36.
- (2) MONTEVERDE, J. J. *Aspectos de la enfermedad de Newcastle en Argentina y Lucha contra la enfermedad de Newcastle en Argentina*. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Boletín Especial N° 2 (1961) 16-22 y 31-43.
- (3) RAMÍREZ VALENZUELA, M. *Variantes del virus de la enfermedad de Newcastle; sus similitudes y diferencias. I Symposium de la Enfermedad de Newcastle*. Secret. Agr. y Ganad. México. Foll. Misc. N° 11 (1960) 36-46.
- (4) CAMARGO NÚÑEZ, F.: *Selección de cepas de virus para la producción de vacunas contra la enfermedad de Newcastle. I Symposium de la Enfermedad de Newcastle*. Secret. Agr. y Ganad. México. Foll. Misc. N° 11 (1960) 56-62.

## CUADRO N.º 1

## PRUEBA DE AGLUTINACION DE HEMATIES (AH)

Hematies	Virus de la Enfermedad de Newcastle	
	Cepa Córdoba	Cepa Quilmes
Pollo	+++	+++
Perro	+++	+++
Cabra	+++	+++
Vaca	++	++
Cobayo	++	++
Caballo	—	—
Gato	—	—
Oveja	++	++
Ratón	++	++
Humano	+	+

+++ : significa título superior a 1: 128.

++ : significa título 1: 64 a 1: 128.

+ : significa título 1: 8 a < 1: 64.

— : significa título < 1: 8.

Las restantes pruebas comparativas se resumen en el cuadro N° 2 que va seguidamente.

CUADRO N.º 2

	Cepa Córdoba VEN	Cepa Quilmes VEN
<p><i>Embriones de pollo</i></p> <p>Lesiones macroscópicas; muertos aprox. 36 hs. con 0,1 ml de <math>10^{-3}</math> liq. alantoideo DL 50 e. p. <math>10^{-9}</math>..</p> <p>Lesiones microscópicas .....</p> <p>DI 50 (AH en líquido alantoideo) DL 50 embriones de pollo Muerte de los embriones de pollo inoculados con 0,1 ml de <math>10^{-3}</math></p>	<p>Congestión evidente del embrión. Membranas aparentemente normales.</p> <p>Infiltración linfocitaria y hemorragias discretas en meninges. En SNC infiltración linfocitaria perivascular, movilización células de la glía, alteración de neuronas; cromatolisis.</p> <p><math>10^{-9}</math> <math>10^{-7,5}</math></p> <p>36-48 horas</p>	<p><math>10^{-8,5}</math> <math>10^{-8,5}</math></p> <p>36-48 horas</p>
<p><i>Ratón lactante</i></p> <p>Inoculación intracerebral</p> <p>Inoculación intraperitoneal</p>	<p>Mata entre 5º y 7º día, con aparición de sintomatología.</p> <p>No se comprueban muertes.</p>	
<p><i>Efecto citopatogénico (HeLa)</i></p> <p>A las 24 horas de incubación</p>	<p>Francamente positivo</p>	
<p><i>Viremia</i></p> <p>Pollos susceptibles</p> <p>Pollos vacunados con virus muerto</p> <p>Pollos recobrados de infección natural con cepa Quilmes</p> <p>Pollos recobrados de infección natural con cepa Córdoba</p>	<p>Positiva durante 3 días seguidos luego de inoculación endovenosa.</p> <p>Negativa a las 24 horas</p> <p>Negativa a las 24 horas</p> <p>Negativa a las 24 horas</p>	
<p><i>Suero neutralización</i></p> <p>Suero antinewcastle (cepa Quilmes)</p> <p>Suero antinewcastle (cepa Córdoba)</p>	<p>Neutralizado</p> <p>Neutralizado</p>	<p>Neutralizado</p> <p>Neutralizado</p>
<p><i>Prueba IA ..</i></p> <p>Suero antinewcastle (cepa Quilmes)</p> <p>Suero antinewcastle (cepa Córdoba)</p>	<p>640</p> <p>5120</p>	<p>640</p> <p>640</p>