Desarrollo de un disolvente coloreado para facilitar la aplicación conjuntival de las vacunas vivas Rev 1 y B-19

J. Fanlo, M.J. Grilló, M.P. Jiménez de Bagués , J.M. Blasco.
Dpt. Sanidad Animal. SIA/DGA. Ap. 727. 50080 Zaragoza.

La vacunas vivas B-19 y Rev 1 son las vacunas de elección para la profilaxis de la brucelosis bovina y ovina, respectivamente (Nicoletti 1990; Blasco 1990). Dichas vacunas han sido ensayadas por las vías subcutánea, conjuntival, oral e intradérmica y, de todos estos procedimientos, la vacunación conjuntival proporciona los mejores resultados en cuanto a protección con la mínima respuesta serológica, permitiendo compatibilizar la vacunación con el diagnóstico serológico ulterior (Plommet 1984; Nicoletti 1990; Blasco 1990). El protocolo más adecuado consiste en la inoculación conjuntival de 0,1 a 0,5 x 10^{10} unidades formadoras de colonia (vacuna B-19) o de 0,5 a 1 x 10^{9} (vacuna Rev 1) en un volumen de 30 μl, en animales de 3 a 6 meses de edad (Plommet 1984; Blasco 1990). Uno de los problemas prácticos con los que se encuentra el veterinario a la hora de realizar la vacunación conjuntival es que, debido a que el disolvente (agua destilada) de la vacuna es incoloro, existe dificultad para saber si la gota de vacuna ha sido depositada correctamente en el saco conjuntival o por el contrario ha sido derramada fuera o expulsada por lacrimeo. El objetivo del presente trabajo consistió en desarrollar un disolvente coloreado para facilitar la aplicación conjuntival de las vacunas B-19 y Rev 1 sin afectar a las características intrínsecas de las mismas.

Se seleccionaron 12 colorantes de fácil adquisición y de uso común en los laboratorios de microbiología, solubles en agua y estables tras autoclavado: Azul de Evans (Merck), Verde Malaquita Oxalato (Panreac), Verde luz (Fluka), Negro Amido 10B (Panreac), Azul de Toluidina (Panreac), Eosina (Panreac), Safranina (Panreac), Azul de Metileno (Panreac), Hematoxilina (Merck), Azul Alcian (Difco), Verde Metilo (Panreac) y Rojo Neutro (Merck). Los colorantes seleccionados fueron suspendidos en agua destilada a razón de 10, 50, 100, 500 y 1000 μg/ml, para realizar una prueba de visualización en campo. Varias temeras de capa y párpado oscuros (Parda Alpina) o claros (Pirenaica) y varias corderas de capas clara (Rasa Aragonesa) y oscura (Romanov) fueron inoculadas conjuntivalmente con 30 μl de cada una de las suspensiones de colorante y la intensidad del color y facilidad de visualización del inóculo valorada por 5 personas, en dos pruebas repetidas con una semana de intervalo. La Hematoxilina, Azul Alcian, Azul de Toluidina, Verde Metilo, Verde Luz y Rojo Neutro fueron descartados por su débil contraste y/o dificultad de visualización en el interior de la conjuntiva. Lo mismo ocurrió con los restantes colorantes cuando se emplearon concentraciones de 10 μg/ml, por lo que esta concentración fue descartada en los siguientes estudios. En el caso de colorantes rojos (Eosina y Safranina), tan sólo concentraciones de 500 μg/ml o superiores, fueron tenidas en cuenta por su adecuada visualización en la prueba de campo.

Las cepas B-19 y Rev 1 fueron inoculadas en placas de Blood Agar Base (BAB) e incubadas a 37ºC en atmósfera conteniendo un 10% de CO_2 durante dos días. Una vez determinada la ausencia de contaminación y disociación (Alton et al., 1988), las bacterias fueron recogidas en solución salina esteril y la suspensión bacteriana ajustada espectrofotométricamente. La concentración exacta se determinó posteriormente mediante diluciones seriadas, siembra en placas y ulterior recuento (Alton et al., 1988).

La primera experiencia se realizó con la vacuna Rev 1. Las suspensiones de Rev 1, preparadas como se ha descrito anteriormente, fueron mantenidas a temperatura ambiente con las distintas concentraciones (50, 100, 500 y 1000 μg/ml) de los colorantes. Tras 30 minutos de contacto con el colorante, se realizaron 7 diluciones seriadas (al 1/10) de la suspensión inicial, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Tres gotas de 25 μl de cada una de las cuatro últimas diluciones fueron sembradas por duplicado BAB, para obtener tres recuentos de cada dilución, a partir de los cuales realizar un estudio estadístico adecuado. Una de las placas fue incubada durante 4 días a 37º C en atmósfera sin CO_2 y la otra en las mismas condiciones pero en atmósfera con un 10% de CO_2. Este mismo protocolo fue realizado con las suspensiones vacuna-colorante transcurridas 2 y 4 horas de contacto a temperatura ambiente. Todos los experimentos incluyeron un lote control en el que la suspensión vacunal no se puso en contacto con ningún colorante. Transcurridos los 4 días de incubación, se procedió al recuento colonial y a la inundación de placas con solución de Cristal Violeta-Oxalato, para la determinación del grado de disociación (Alton et al 1988). Con los tres recuentos procedentes de aquella placa que contenía el mayor número contable de colonias, se calculó la media y la consiguiente concentración en la dilución inicial, expresándose este dato como logaritmo decimal. Se realizó un análisis de varianza para determinar la influencia de los diferentes

colorantes, de los tiempos de contacto vacuna-colorante y de la atmósfera de incubación. El efecto de cada colorante respecto del control se determinó mediante el test T de Student. El analisis de varianza de los valores medios de los recuentos de Rev 1 obtenidos para cada concentración de colorante y tiempo de contacto no mostró diferencias entre las condiciones de incubación, por lo que los datos (Tabla 1) corresponden a los valores obtenidos en atmósfera normal. Sin embargo sí se encontraron diferencias entre colorantes y entre tiempos de contacto vacuna-colorante. El Verde Malaquita impidió el crecimiento de Rev 1 tras 30 minutos de contacto ya a concentraciones de 100 μg/ml. El Azul de Metileno, tuvo un comportamiento similar, pero precisó de concentraciones mas elevadas para inhibir el crecimiento de Rev 1. La Safranina y la Eosina, a concentraciones de 500 y 1000 μg/ml redujeron significativamente el número de Rev 1 viables ($p< 0,001$). El Azul de Evans y el Negro Amido, independientemente del tiempo de contacto y de concentración, no afectaron al crecimiento normal de Rev 1. Además, ninguno de estos dos últimos colorantes produjo disociación colonial, tras visualización de las placas teñidas con la solución de Cristal Violeta-Oxalato. Es de destacar el elevado grado de disociación de Rev 1 que produjo la Eosina (superior al 50%).

Tabla 1. Valores medios (expresados como logaritmo) de los recuentos de Rev 1 viables, obtenidos para cada concentración de colorante y tiempo de contacto con los mismos.

Colorante	Concentración (μg/ml)	30 min	2 horas	4 horas
Control		8,83	8,92	8,92
Azul Evans	50	8,76	8,86	8,93
	100	8,86	8,91	8,91
	500	8,66	8,90	8,79
	1000	8,93	8,84	8,90
Negro Amido	50	8,84	8,80	8,79
	100	9,01	8,94	8,84
	500	8,79	8,95	8,86
	1000	8,71	8,93	8,92
V. Malaquita	50	7,93	6,20	NC
	100	NC	NC	NC
	500	NC	NC	NC
	1000	NC	NC	NC
A. Metileno	50	7,90	NC	NC
	100	7,70	NC	NC
	500	NC	NC	NC
	1000	NC	NC	NC
Eosina	500	7,73	7,17	7,16
	1000	7,19	6,81	6,44
Safranina	500	6,43	NC	NC
	1000	NC	NC	NC

NC: ausencia de crecimiento

En el caso de la vacuna B-19 (Tabla 2), se tuvieron en cuenta los datos obtenidos en el caso anterior y no se utilizaron los colorantes que habian demostrado poseer un poder antibacteriano elevado para Rev 1. Además, tan solo se estudiaron concentraciones de 100 μg/ml o superiores, ya que, por debajo de estas concentraciones, ningún colorante, excepto la Eosina, fue adecuadamente visualizado en vacas de capa oscura. Debido a ello, y a pesar de que la Eosina mostró un cierto poder antibacteriano para la cepa Rev 1, decidimos utilizarla para el caso de la B-19. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores medios (expresados como logaritmo) de los recuentos de bacterias B-19 viables, obtenidos para cada concentración de colorante y tiempo de contacto con los mismos.

Colorante	Concentración (µg/ml)	30 min	4 horas
Control		8,79	8,92
Azul Evans	100	8,87	8,92
	500	8,83	8,91
	1000	8,73	8,91
Negro Amido	100	8,76	8,89
	500	8,81	8,90
	1000	8,80	8,94
Eosina	100	8,88	8,97
	500	8,75	8,81
	1000	8,70	8,94

Ninguno de los dos colorantes azules modificó significativamente el número de B-19 viables con respecto al control. La principal diferencia respecto a la vacuna Rev 1 fué que la Eosina no modificó el crecimiento de B-19. Además, ninguno de los colorantes produjo disociación de la cepa B-19. La utilidad práctica principal de estos solventes coloreados sería determinar con precisión la posible pérdida de suspensión vacunal. Caso de haber pérdida, la inoculación debería repetirse en el otro ojo del animal. De entre los diferentes colorantes que han demostrado cumplir el objetivo propuesto, destaca el Azul de Evans por la preferencia de las personas que realizaron la evaluación a nivel de campo. Como este producto se ha mostrado inocuo para ambas cepas vacunales, se recomienda usar la concentración mas elevada de las tres testadas, asumiendo cierta dificultad de visualización en terneras de parpado oscuro. Aunque lo más adecuado, una vez realizada la disolución, sería esperar unos 10 minutos para que la cepa liofilizada recobre su vitalidad y proceder rápidamente a la vacunación, esta se podría retardar hasta 4 horas desde la disolución del producto vacunal sin que se afectase significativamente la calidad de las vacunas.

BIBLIOGRAFIA

Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D., Verger J.M., 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA ed. 147 rue de l'Université, 75007 Paris. France.

Blasco J.M., 1990. Control y profilaxis. Brucelosis ovina. Ovis, 8, 65-69.

Nicoletti P., 1990. Vaccination. En: Animal brucellosis. K. Nielsen and J.R. Duncan ed. CRC Press, Boca Raton. FL.USA. pp. 283-299

Plommet M., 1984. Progrés recents en immunisation contre l'infection à *Brucella abortus*. Immunisation chez les bovins. Prev. Vet. Med., 2, 205-214.