

*ENFERMEDAD DE MAREK: II — Reproducción experimental
de la enfermedad (*)*

A. A. SCHUDEL (**)
M.E. ETCHEVERRIGARAY

RESUMEN

Se realizaron con éxito investigaciones tendientes a reproducir experimentalmente la Enfermedad de Marek de las aves. Se obtuvieron 10 aislamientos caracterizados como virus Herpes, a partir de material extraído de planteles comerciales con diagnóstico patológico de Enfermedad de Marek y provenientes de diferentes puntos geográficos del país. En todos los casos el agente aislado demostró una estrecha asociación celular y la reproducción de la enfermedad se logró fácilmente con preparaciones celulares infectadas. De dos de los aislamientos, FCV-5 y FCV-6, se obtuvo virus libre de elementos celulares, reproduciendo la enfermedad en aves y reaislando al agente en cultivos celulares. En ambos casos el agente pasó previo a la inoculación por filtros de 450 mm de diámetro de poro, pero fue retenido por filtros de 100 mm de diámetro.

MAREK'S DISEASE II — EXPERIMENTAL REPRODUCTION

SUMMARY

Through several experiments, MD was successfully transmitted and experimental reproduction achieved. Virus was isolated from 10 different field outbreaks and maintained in cell cultures. In all cases MD infectivity for chickens was highly cell-associated and the propagation of the isolated agent to chicks accomplished when cells were present in the inoculum. From two isolates, FCV-5 and FCV-6, cell-free virus was obtained from feather follicle and MD successfully reproduced. The agent was not retained by 450 mm. membrane filters but no infectivity was recovered after filtration through 100 mm filters.

(*) Trabajo realizado en la Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP, 60-118, La Plata, con subsidios N° 4591/70 del CNIC y T y 2109/70 de la CIC de la Provincia de Buenos Aires.

(**) Miembro de la Carrera de Investigador Científico del CNIC y T.

INTRODUCCION

Con el nombre de enfermedad de Marek se describe una enfermedad infecciosa y linfoproliferativa de las aves, conocida por un gran número de sinónimos (polineuritis (9), neurolinfomatosis (11), parálisis de las aves, parálisis de Marek) Es una enfermedad de etiología viral, infecciosa y contagiosa en cuyo cuadro patológico intervienen formas neoplásicas linfoides y procesos inflamatorios con una característica predilección por el sistema periférico.

Causada por un virus Herpes (7-17), de características oncogénicas ha sido recientemente aislado en el país (14). Produce severas pérdidas económicas en las explotaciones comerciales de tipo intensivo, caracterizándose por afectar seriamente a las aves entre 8-20 semanas de vida, aunque puede presentarse fuera de ese lapso. Se reconocen dos formas clínicas de la enfermedad clásica, en la que predominan las lesiones

neurales y aguda, con tumoraciones viscerales, esta última ha experimentado un notable incremento en su incidencia conjuntamente con el desarrollo de métodos de crianza intensivos.

La reproducción experimental de la enfermedad ha sido perfectamente establecida por Calnek y col. (4) y Nazerian y Witter (10) utilizando filtrados libres de elementos celulares obtenidos de folículo de pluma. Trabajos posteriores demostraron que el folículo de pluma es el sitio de replicación viral (3).

El objetivo central de nuestro trabajo es la reproducción de la enfermedad con los aislamientos realizados por nosotros en el país durante 1970-1972 (14-15), y como objetivo secundario, evaluar de acuerdo al muestreo realizado las características de los aislamientos en base a su patogenicidad experimental.

MATERIALES Y METODOS

Aves: Se utilizaron pollitos de 1 día de edad de una línea comercial, con anticuerpos maternos contra Enfermedad de Marek.

Localización: Las aves de experiencia se mantuvieron en un cuarto con relativo aislamiento, desinfectando luego de cada expe-

riencia, y trabajando con un aislamiento por vez. Los controles llevados en paralelo a cada experiencia se criaron en lugares alejados, con mantención y personal de atención diferente.

Toma de muestras: Para el reaislamiento del agente se pro-

cedió según (15). En los casos en que se extrajo piel, se trituró con tijera, homogeneizando luego a 30.000 rpm. y resuspendiendo en PBS pH 7,4 1/10 (peso/volumen), centrifugando posteriormente a 600xg 15' y tomando el sobrenadante se lo somete a dos ciclos de sonicación (30" y 80 Kv) filtrándolo finalmente a través de membranas de 450 nm y 100 nm de diámetro de poro.

Inoculum: Se utilizó 0,2 ml de una suspensión celular en PBS tal como se describe en (15) por vía intraperitoneal a pollitos de un día de edad o a cultivos celulares. Los controles recibieron solo células sin infectar en PBS o bien PBS solo en 0,2 ml de volumen.

Histopatología: Todas las aves muertas se examinaron histopatológicamente (nervios periféricos, hígado, bazo, riñón, bolsa de Fabricius, gonadas y tumores).

Anticuerpos: Detectados por el método de precipitación en agar según (6).

Origen de los aislamientos: FCV-1, de 7 pollas de postura del partido de Munro, de 42 días de edad, con pérdidas estimadas en

un 8 0/o y forma de presentación neural-visceral. FCV-2, de 6 pollas de postura de 14 semanas, de Mar del Plata, con presentación clásica y mortalidad del 3 0/o. FCV-3, de 16 aves de postura de 23 semanas de Concepción del Uruguay, con presentación clásica y pérdidas estimadas en un 3 0/o. FCV-4, de 8 aves de postura de 17 semanas de La Plata, con presentación clásica y pérdidas estimadas en 6 0/o. FCV-5 de 7 pollos parrilleros de 9 semanas de la Provincia de Córdoba, con presentación clásica de la enfermedad. FCV-6, de 6 pollas de postura de 20 semanas de Pilar, con presentación visceral y 8 0/o de mortalidad. FCV-7, de 11 pollas de postura de 26 semanas de La Plata, con presentación clásica. FCV-8, de 9 pollos parrilleros de 17 semanas, de la zona de Pilar con mortalidad de 18 0/o y presentación visceral. FCV-9, de 20 pollas de postura de 16 semanas, de la zona Mar del Plata, con presentación clásica. FCV-10, de 7 pollos machos parrilleros de 60 días de Bahía Blanca con presentación clásica con lesiones neurales y viscerales.

RESULTADOS

La reproducción experimental de la enfermedad se intentó con inoculum celulares y plasma, CUADRO Nro. 1, sin embargo la posibilidad de obtención de virus libre de elementos celulares a partir de piel de aves enfermas se realizó con tres de nuestros

aislamientos (FCV-4, FCV-5 y FCV-6). Tal como se detalla en CUADRO Nro. 1, en los casos estudiados se realizó virus en cultivos celulares, se observaron lesiones macro y microscópicas y se detectó la presencia de anticuerpos específicos en aves experimen-

talmente inoculadas, resultando negativos los intentos de aislamientos en las aves utilizadas como controles.

A fin de reproducir la enfermedad por la inoculación de cultivos celulares infectados con los agentes aislados, se inocularon pollitos de 1 día de edad por vía intraperitoneal con 2×10^6 células/ave en 0,2 ml de volumen. Los resultados se presentan en el CUADRO Nro. 2.

Para cumplimentar los postulados de Koch y atribuir así la correspondiente etiología a nuestros aislamientos, tomamos como prototipos a dos de ellos, FCV-5 y FCV-6, inoculando 10 aves con 0,5 ml de sangre heparinizada de los aislamientos originales a cada pollo por vía intraperitoneal. A las 12 semanas P.I. de las aves que presentaban lesiones neurales y viscerales mas severas se extrajo piel y se procesó según Materiales y Métodos, inoculando por vía intraperitoneal 0,2 ml a pollitos de 1 día de edad y cultivos

celulares de fibroblastos de embrión de pato. Simultáneamente se utilizó como control negativo material procesado en la misma forma extraído de pollitos de 1-7 días no inoculados. Los animales inoculados se mantuvieron en aislamiento durante 17 semanas, realizando tomas de muestras en forma semanal. Todas las aves muertas durante el período experimental se necropsiaron y estudiaron microscópicamente. A las 12 semanas P.I. se tomaron 2 pollos con síntomas clínicos evidentes y luego de sacrificados, se obtuvo virus libre de células a partir de piel en la forma ya descrita, inoculando pollitos de un día de edad y cultivos celulares, obteniendo en ambos casos resultados positivos al presentar los pollitos inoculados lesiones macro y microscópicas de E. de Marek y efecto citopatogénico en cultivos celulares, no así con el material procesado como control. Los resultados se detallan en el CUADRO Nro. 3.

DISCUSION

La estrecha asociación celular del agente etiológico de Enfermedad de Marek en cultivos celulares, dificulta la obtención de resultados inequívocos que impliquen al agente aislado como la causa etiológica de la enfermedad, sin embargo todas las evidencias aportadas en cuanto a aislamiento y reproducción de la enfermedad in-vivo con filtrados libres de ele-

mentos celulares por este trabajo y referencia a los resultados obtenidos por otros (13410) nos permiten atribuir a nuestros aislamientos relación causal con la enfermedad.

Los 10 aislamientos realizados presentaban la forma clásica de la enfermedad, pese a la presencia de lesiones viscerales en varios de ellos. No podemos descartar que

10 aislamientos luego de las cepas experimentales (u originalmente) estuvieran constituidos más de una cepa (2 5), sin embargo observando nuestros resultados podríamos inferir que todos los aislamientos realizados a excepción de FCV-6 y FCV-8 de baja patogenicidad. Datos en cierta forma son corroborados en el CUADRO Nro. 3, de se parte de cultivos celulares como inoculum.

La obtención de virus libre de cultivos celulares de folículo de na (4 10) tiene íntima relación con la transmisión de la enfermedad. En nuestro caso se ayó su obtención sólo en alguno de los aislamientos, pues la tica un tanto laboriosa sobre o en la obtención de suficiente erial libre de contaminantes a inocular sobre cultivos celu-

lares. La retención de la infecciosidad del material por filtros de 100 mm de diámetro de poro corroboran datos obtenidos en otras experiencias (8 5, 15).

En los sucesivos pasajes de los aislamientos FCV-6, FCV-8 y FCV-9 es posible observar que se mantienen las características patológicas de cada una de ellas pese a los varios pasajes. El hallazgo de anticuerpos en aves inoculadas con cepas de baja o alta patogenicidad es constante, por lo que la producción de anticuerpos no estaría determinada por la patogenicidad de la cepa. Las lesiones macroscópicas y microscópicas halladas, no varían de las ya descritas por otros (12 13) sin embargo con la cepa FCV-6 se observaron severas infiltraciones nerviosas y cambios degenerativos en Bolsa de Fabricius a las 6-8 semanas P.I.

CONCLUSIONES

aves de planteles comerciales con diagnóstico patológico de enfermedad de Marek se realizaron 10 aislamientos, que fueron caracterizados como virus Herpes. El material proveniente de piel (V₄ - FCV₅ - FCV₆) se reaisló en cultivos celulares en donde se observaron lesiones mayores y microscópicas, y en aves inoculadas con estos materiales se

detectaron anticuerpos precipitantes, siendo negativos los aislamientos realizados con material del lote de animales de control.

Los aislamientos de virus libre, inoculación en aves y el posterior reaislamiento del virus en cultivos celulares nos permite atribuir a nuestros aislamientos relación causal con la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor A. Vilches por su apoyo. Al Sr. D. D'Andrea por su eficiente colaboración técnica. A Arbor Acres Argentina por el suministro de aves y huevos embrionarios.

CUADRO Nro. 1

Detalle de aislamiento, materiales originarios, aislamientos en cultivo celular y resultados de la inoculación de ese mismo material a pollos B.B. de un día de edad

AISLAMIENTO		INOCULUM	CULTIVOS CELULARES			INOCULACION EN POLLOS				CON-TROL
			FEPo	REP	FEPa	ANTIC.	MORT.	LMa	LMi	
FCV-1	Clásica V-N	Sangre Heparinizada	+	+	+	6/6	3/10	4/10	10/10	0/5
FCV-2	Clásica N	Sangre Heparinizada	NT	+	+	5/5	0/5	3/5	5/5	0/5
FCV-3	Clásica N	Sangre Hep. Plasma	+ -	+ NT	NT -	5/5 3/5	0/5 0/5	4/5 0/5	5/5 0/5	0/5
FCV-4	Clásica N	Sangre Hep. Piel	NT NT	+ +	+ +	9/10 4/4	2/10 1/10	6/10 7/10	10/10 10/10	0/4
FCV-5	Clásica N	Sangre Hep. Bazo Piel	NT	NT + +	+ + +	6/6 6/6 6/5	1/6 0/6 0/5	5/6 3/6 4/6	6/6 6/6 5/5	0/5
FCV-6	Clásica N-V	Sangre Hep. Tumor Piel	+ + +	+ + +	+ + +	9/10 10/12 6/6	4/10 6/12 3/6	7/10 8/12 4/6	10/10 12/12 6/6	0/6
FCV-7	Clásica N-V	Sangre Hep. Plasma	NT	+ -	+ -	6/6 0/5	1/10 0/5	6/10 0/5	10/10 2/5	0/5
FCV-8	Clásica N-V	Sangre Hep. Tumor	+ +	NT	+ +	4/4 5/5	6/10 5/8	7/10 4/8	10/10 8/8	0/6
FCV-9	Clásica N	Sangre Heparinizada	+	NT	+	4/4	1/10	6/10	8/10	0/5
FCV-10	Clásica N-V	Sangre Heparinizada	+	NT	+	7/7	2/10	7/10	10/10	0/5

FEPo: Fibroblasto embrión pollo
 FEPa: Fibroblasto embrión pato
 REP: Riñón embrión pollo
 NT: No testado

LMa: Lesiones macroscópicas positivo/ total
 LMi: Lesiones microscópicas positivo/total
 Anticuerpos, Morbilidad positivo/total
 +: Efecto citopatogénico
 -: No efecto citopatogénico.

CUADRO Nro. 2

Reproducción de la enfermedad en pollitos BB de 1 día de edad con los diferentes aislamientos por inoculación de cultivos celulares infectados con cada una de las cepas y con citopatogenicidad confluyente

Num.	Nro.	Anticuerpos	Mortalidad	LMa	LMi	Controles
-1	12	6/6	3/10	7/10	10/10	0/5
-2	10	3/3	1/10	5/10	9/10	0/5
-3	7	5/5	3/7	6/7	6/6	0/5
-1	10	5/5	1/10	3/10	10/10	0/6
-5	8	5/5	3/8	6/8	8/8	0/5
-6	10	5/5	6/10	9/10	10/10	0/6
	10	4/4	4/10	9/10	10/10	
+	10	5/5	5/10	7/10	9/9	
-7	8	5/5	1/8	4/8	7/7	0/5
-8	8	5/5	6/8	8/8	8/8	0/6
+	8	4/4	4/8	3/8	7/7	
-9	10	6/6	2/10	7/10	10/10	0/5
-10	8	5/5	0/8	1/8	6/8	0/5

: Fibroblasto de embrión de pato
 : Fibroblasto de embrión de pollo
 Riñón de embrión de pollo
 uerpos, Mortalidad y Controles : positivos :
 Lesiones macroscópicas
 Lesiones microscópicas

CUADRO Nro. 3

Aislamiento, Reproducción y Reaislamiento
de virus de Enfermedad de Marek

Aislamiento Nº	Aislamiento		Filtro	Reproducción		Reaislamiento	
	Pollos	Cultivos Celulares		Cultivos Celulares	Pollos	Cultivos Celulares	Pollos
FCV-5	+	+	450 nm	+	+	+	+
			100 nm	-	-	-	-
CONTROL	-	-	450 nm	-	-	-	-
FCV-6	+	+	450 nm	+	+	+	+
			100 nm	-	-	-	-
CONTROL	-	-	450 nm	-	-	-	-

CUADRO Nro. 4

Resultados de pasajes seriados de tres diferentes aislamientos

Aislamiento	PASAJES													
	1	2	3	4	5	6	7							
M	A	A	A	A	A	A	A							
M	M	M	M	M	M	M	M							
FCV-6	21/30	7/7	6/12	5/5	18/32	4/4	5/15	6/6	8/16	3/3	9/15	6/6	13/20	6/6
FCV-8	10/30	3/3	4/10	2/2	8/20	5/5	6/15	3/3	NT	NT	NT	NT	NT	NT
FCV-9	1/20	2/2	2/15	2/2	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

M: Mortalidad positivo/total
 A: Anticuerpos positivo/total
 NT: No testado

BIBLIOGRAFIA

1. BIGGS P. PAYNE L. "Studies on MD. I—Experimental Transmission". *J. Nat. Cancer Inst.* 39, (267-280). 1967.
2. BIGGS P., MILNE B.S. "Biological properties of a number of MD isolates" *Oncogenesis and Herpesviruses. Lyon Int. Agenoy for Reserch of Cancer* (88-94). 1972.
3. CALNEK B., HETCHENER S. "Localization of viral antigen in chikens infected with MD herpes virus". *J. Nat. Cancer. Inst.* 43, (935-949). 1969.
4. CALNEK B. ADLDINGER H. KAHN D. "Feather Follicle epithelium a source of enveloped and infectious cell free herpesvirus from MD" *Avian Disease*, 14 (219-233). 1970.
5. CHO B. KENZY S. "Dual infection of chikens with Acute and mild strains of MD". *Avian Disease* 17, 2 (390-395). 1973.
6. CHUBB R., CHURCHILL A. "Precipitating antibodies associated with MD" *Veterinary Record* 83 (4-7). 1968.
7. CHURCHILL A. BIGGS P. "Agent of MD in tissue culture". *Nature* 215 (528-530). 1967.
8. CHURCHILL A., BIGGS P. "Herpes type virus isolated in cell cultures from tumor of chikens with MD. II—Studies in—vivo". *J. Nat. Cancer Inst.* 41, 4, (951-956). 1968.
9. MAREK J. "Multiple Nervenentzündung (Polyneuritis) bei Hüh nern" *Deutsch Tier-rärztl Wsohr.* 15, (417-421). 1907.
10. NAZERIAN K. WITTER R.L. "Cell free transmission and in-vivo replication of MD virus" *Journal of Virology* (388-397). 1970.
11. PAPPEHHEIMER A. DUNN L, CONE V. "A study of fowl paralysis (neuro-lym-phomatosis gallinarum). *Storrs Agr. Exp. Station Bull* Nro. 143 (186-290). 1926.
12. PAYNE L. BIGGS P. "Studies on Marek's Disease II—Pathogenesis" *J. Nat. Cancer Inst.* 39 (281-303). 1967.
13. PUROHASE H.G. BIGGS P. "Characterization of five isolates or Marek's Disease" *Res Veterinary Science* 8, 4, (440-449). 1967.
14. SCHUDEL A.A. ETCHEVERRIGARAY M.E. SONCINI R. MENENDEZ, N. "Enfermedad de Marek en Argentina: aislamiento del agente causal". *V. Congreso Latinoamericano de Microbiología, Punta del Este, Uruguay.* 1971.
15. SCHUDEL, A.A. ETCHEVERRIGARAY M.E. "Enfermedad de Marek: I—Aislamiento y caracterización in-vitro". *A publicar en esta revista.*
16. SEVOIAN M. CHAMBERLAIN D. "Avian Lymphomatosis I—Experimental reproduction of the neural and visceral form". *Vet. Med.* 57 (500-501). 1962.
17. SOLOMON J.H. WITTER R.L. NAZERIAN K. BURMESTER B. "Studies on the ethiology of MD I—Propagation of the agent in cell culture". *Proc. Soc. Exp. Bio.* 127, (173-177). 1968.