

DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE MAREK EN LAS AVES

Marcia Ramirez *

RESUMEN

En el diagnóstico de la enfermedad de Marek de las aves, se demuestra la importancia del método histológico, mediante el estudio de la infiltración linfocitaria en nervios ciáticos.

Se estudia el comportamiento del agente etiológico de la enfermedad sobre membrana corio-alantoidea de huevos embrionados de 19 días, inoculados con virus de campo y el efecto citopático del virus vacunal en cultivos celulares de fibroblastos de embrión de pollo.

INTRODUCCION

En 1907, Marek describió por primera vez una afección en pollos jóvenes a la cual denominó polineuritis. Esta se caracterizaba por cojera, tumefacción variable en nervios periféricos y raíces espinales causada por infiltración mononuclear (4).

Posteriormente se complementó el reporte de Marek, al demostrarse que las lesiones no estaban restringidas a nervios periféricos y nervios espinales, sino que éstas eran frecuentemente acompañadas de ceguera, parálisis y que las lesiones extraneurales incluían linfomatosis visceral así como infiltración del iris y del cerebro (5).

El descubrimiento y la reproducción en tejido celular del grupo *B herpes virus*, como el agente etiológico de la enfermedad, se lograron casi en forma simultánea por Churchill & Biggs (1967) en Gran Bretaña y Nazerian *et al.* (1968) en los Estados Unidos (5).

Tal vez, el resultado práctico más importante fue la atenuación del virus y la utilización exi-

* Cátedra de Patología Aviar. Escuela de Medicina Veterinaria UNA. Apdo. 86, Heredia, Costa Rica.

tosa de este virus atenuado como vacuna contra la enfermedad de Marek.

La transmisión horizontal quedó comprobada cuando se descubrió que el virus se reproduce y alcanza su completo estado infeccioso en el epitelio del folículo plumífero (5).

Solomon *et al.* (1970) aportaron una fuerte evidencia contra la transmisión vertical, basando sus observaciones en un estudio en tejidos de embriones y pollos recién nacidos, en los cuales no fue posible aislar el virus y tampoco se observó lesión alguna, macro o microscópica en nervios periféricos (9).

Se ha demostrado que el *Gallus domesticus* es el más importante huésped para el virus de Marek y que la afección es rara en otras aves. La infección natural aparece entre el segundo y quinto mes y va desapareciendo conforme la parvada alcanza su madurez sexual.

Este virus herpes puede provocar una variedad de reacciones histológicas observables clínicamente, todas de carácter linfoide: neural, ocular, cutánea y visceral. Cuando la lesión es predominantemente visceral, sin compromiso macroscópico de nervios, se habla de "Enfermedad de Marek Aguda", mientras que la forma en la cual el compromiso neural predomina, se denomina "Enfermedad de Marek Clásica", caracterizada por paresia progresiva y luego completa parálisis de una o más extremidades, debido a que uno o más nervios del cuerpo pueden estar afectados.

Una actitud particularmente característica es aquella en que el ave tiene una extremidad extendida hacia adelante y la otra hacia atrás, como resultado de la lesión vírica en nervio ciático (5).

El incremento de la enfermedad de Marek en Costa Rica durante los dos últimos años, reportado por Fonseca (1979), atribuido a la posible falla en el manejo de la vacuna y las sensibles bajas que sufren los lotes afectados durante el desarrollo, constituyeron los motivos para la realización del presente trabajo, utilizando el método de diagnóstico histopatológico, intentando además el aislamiento vírico en huevos embrionados y líneas celulares, mediante la inoculación de un macerado de órganos. Se tomará como patrón para la interpretación de las lesiones, el efecto causado por la vacuna comercial en la membrana corio-alantoidea y en la línea celular (3).

MATERIALES

En la elaboración de este trabajo, se requirió de aves presentando la sintomatología clínica de la enfermedad de Marek, huevos fértiles, equipo de laboratorio para virología e histología, además de los siguientes reactivos:

- Earle's BSS (Earle, 1943) (7);
- Solución de Hanks (1x);
- Solución de LAHT (2x);
- Solución de Tripsina (0.25x).*

MÉTODOS

Se visitaron las diferentes granjas avícolas, sobre todo aquellas donde se conocía la persistencia del virus de Marek.

En dichas explotaciones se realizó una exhaustiva anamnesis de las parvadas afectadas y de su ambiente.

Se seleccionaron las aves más representativas del problema y se les practicó un examen

* FUENTES, L. F. Comunicación personal (1979).

externo, extrayéndose una muestra sanguínea para efectuar pruebas de aglutinación frente a los antígenos de *Salmonella pullorum*, *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma sinoviae*.

Posteriormente se sacrificaron las aves por electrocución, procediéndose luego a practicar la necropsia, de acuerdo con el método descrito por Canek and Witter (citados por Hofstad, *et al.*, 1978) (5).

El diagnóstico positivo de la enfermedad se llevó a cabo mediante histopatología, según el grado de infiltración linfocitaria en nervio ciático.

Preparación de macerado de órganos. De acuerdo con los resultados reflejados por la histopatología, se preparó estérilmente el macerado de órganos (hígado, pulmón, riñón y ovario), siguiendo el método que a continuación se detalla: pesaje de órganos en una balanza eléctrica*; trituración manual de los órganos en un mortero, agregando el medio Earle en una cantidad correspondiente al doble del peso total de las vísceras, centrifugación en frío del macerado a 140 g., utilizando una centrífuga eléctrica**; transvasación del sobrenadante a un tubo de ensayo que contiene 50 mg de sulfato de estreptomina y 50.000 UI de penicilina G-cristalina***. La muestra se dejó en reposo durante 30 minutos, procediéndose a congelar el sobrenadante a -60°C.

Método de inoculación de embriones. La inoculación de embriones se llevó a cabo siguiendo el método de Cunningham (1971) (1). Utilizándose 39

huevos embrionados de 4 días de edad a los cuales se les inyectó 0,2 c.c. de macerado de órganos en saco vitelino y 39 huevos de 10 días de edad que recibieron 0,1 c.c. de macerado de órganos en membrana corio-alantoidea.

Cuatro huevos de cada uno de los grupos citados, fueron tratados previamente con vacuna Anti-Marek*, a una concentración cuarenta veces mayor a la recomendada para uso en avicultura. Asimismo se utilizaron siete huevos control para cada grupo, inoculándose éstos con una cantidad equivalente de solución de Hanks.

Técnica de cultivos celulares. Se aisló fibroblastos de embrión de pollo para los cultivos celulares, siguiendo el método descrito por Prasad, *et al* (1978) (8).

Los cultivos monocelulares fueron inoculados con la misma vacuna Anti-Marek utilizada en la inyección de huevos embrionados.

La vacuna fue reconstituida en 5 c.c. de medio Hanks, utilizando 2 c.c. para un inóculo y los 3 c.c. restantes fueron usados para preparar un rango amplio de diluciones de la vacuna, desde 10^{-1} hasta 10^{-7} .

De seis a ocho días post-inoculación de la línea celular, se procedió a realizar un "pool". Las monocapas fueron sometidas a cambios de temperatura de -60 a 57°C para obtener la ruptura celular y con ello la liberación del "virus", con el fin de realizar un nuevo pasaje de la vacuna. Este procedimiento se repitió tres veces**.

* Mettler E. 2000, Mettler Instruments Corp., Switzerland.

** Dancon. (IEC DIVISION).

*** Glaxo Laboratories Ltd.

* ASL, American-Scientific Laboratories, Madison, Wisconsin, USA. Vacuna liofilizada, herpesvirus de pavo.

** FUENTES, L. G. Comunicación personal (1979).

RESULTADOS

En las aves que fueron seleccionadas para la realización de este estudio, la sintomatología clínica más evidente fue: retardo en el desarrollo, diarrea y dificultad locomotora, en unos casos con leve incoordinación hasta la total parálisis en otros. Los resultados serológicos en todos los casos fueron negativos.

A la necropsia, en dos de los siete casos clínicos estudiados, se observó la forma visceral de la enfermedad de Marek, con presencia de focos tumorales en hígado, riñón, bazo y sistema reproductor.

Macroscópicamente sólo en un caso se presentó engrosamiento de nervio ciático, con pérdida de estriaciones y edema. El examen histopatológico de los nervios recolectados de estas aves, mostró diversos grados de infiltración linfocitaria, desde lesión tipo A caracterizada por una marcada infiltración de células linfoblásticas y de linfocitos, sin presencia de edema, hasta lesión tipo B, esencialmente inflamatoria y caracterizada por infiltración difusa de pequeños y medianos linfocitos y ocasionalmente, linfoblastos con presencia de edema, de acuerdo con la clasificación propuesta por Calnek and Witter (citado por Hofstad, *et al*, 1978) (5).

El efecto de la inoculación del macerado de órganos en huevos embrionados, no fue constante. Únicamente fue posible la observación de una formación de apariencia quística en una de las membranas corio-alantoideas y pequeñas pústulas en otras.

Posterior a la inoculación con vacuna Anti-Marek, únicamente en uno de los huevos inoculados se evidenció la formación de tres pústulas en dicha membrana.

En monocapas de fibroblastos de embrión de pollo, no se obtuvo ningún efecto citopático característico de un virus herpes.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La sintomatología clínica de esta enfermedad, puede ser confundida con la de otras afecciones de origen vírico, bacteriano, parasitario o carencial en las aves.

No se puede basar su diagnóstico en las lesiones macroscópicas del nervio ciático, ya que entre las aves a las cuales se les practicó necropsia, únicamente una presentó alteración de este tipo.

Asimismo, las formaciones tumorales en vísceras abdominales y torácicas, la hepato y esplenomegalia, son común hallazgo postmortem de otras enfermedades, constituyendo así información de poco valor para el diagnóstico de la enfermedad de Marek.

Durante el presente trabajo, se logró obtener los mismos resultados que los encontrados por Calnek and Witter (citados por Hofstad, *et al*, 1978) (5). La dificultad de llegar a un diagnóstico confiable por medio de un análisis macroscópico nos hace concluir que la única forma de obtener un diagnóstico eficaz de esta enfermedad, es por medio del análisis histopatológico para determinar el grado de infiltración del nervio ciático.

El no haber obtenido un patrón de referencia a partir de la inoculación con vacuna Anti-Marek en huevos embrionados, constituyó una de las dificultades para interpretar las lesiones de las membranas corio-alantoideas.

Sin embargo al comparar las membranas corio-alantoideas de los huevos control con la de

los huevos inoculados con el macerado de órganos, fue posible observar que en la mayoría de los casos se evidenció alteración de dicha membrana.

El cultivo de fibroblastos de embrión de pollo (F.E.P.), es considerado un medio adecuado para observar el efecto citopático (E.C.P.) del virus herpes (10).

A pesar de ello, no fue posible observar el E.C.P. característico del agente etiológico de la enfermedad de Marek, que según Prasad and Spradbrow en 1977, se caracteriza por la presencia de células refráctiles esféricas, sincitios de varios tamaños, mostrando las células afectadas un estado progresivo de degeneración y lisis (8).

Los resultados negativos obtenidos con la inoculación de la vacuna comercial en huevos embrionados y en línea celular, podrían relacionarse con varias causas que expliquen el incremento de la enfermedad de Marek en Costa Rica. Una de ellas podría ser el manejo inadecuado de la vacuna ya sea, durante su transporte aéreo, en las aduanas, almacenamiento en las plantas incubadoras y tiempo que transcurre entre la dilución y aplicación del antígeno.

Tampoco se debe descartar la posibilidad de que en el momento de la inoculación existan anticuerpos maternos circulantes capaces de neutralizar la inmunización activa (2).

Además consideramos que el hecho de no contar con huevos libres de todo germen patógeno (S.P.F.), pudo ser un factor de peso en los resultados obtenidos.

Basados en los argumentos anteriores, se hace evidente la urgente necesidad de establecer en nuestro país la titulación sistemática de esta vacuna antes de autorizar su comercialización.

En futuros trabajos, recomendamos el uso simultáneo de cultivos de riñón de pollo paralelamente con F.E.P., debido a que los primeros presentan una mayor sensibilidad al E.C.P. del virus herpes de la enfermedad de Marek (10).

Además es recomendable intentar el aislamiento del virus de campo, en los dos tipos de cultivos celulares, previamente inoculados con macerado de órganos afectados.

Con el propósito de determinar si la inactividad de la vacuna radica en su manejo, deben realizarse estudios comparativos utilizando vacunas procedentes de las incubadoras comerciales y vacunas importadas en forma directa.

SUMMARY

The importance of histopathological techniques in diagnosing Marek's disease in birds, is shown through studies of the lymphocytic infiltration in sciatic nerves.

The effects of the etiological agent of the disease in chorio-allantoic membrane of embryonate eggs 19 days old inoculated with field virus and the cytopathic effect of the vaccine virus in cellular cultures of chicken embryo fibroblasts are studied.

Agradezco la ayuda técnica de los Dres. Edwin Fonseca y Richard Taylor en la elaboración de este trabajo, así como la colaboración brindada por el personal de las cátedras de Virología de la Universidad de Costa Rica y de Patología e Histología de la Universidad Nacional.

BIBLIOGRAFIA

1. CUNNINGHAM, C.H. *Virología Práctica*. Zaragoza, Acribia, 57-62 (1971).
2. EIDSON, C.S., PAGE, R.K., KLEVEN, S.H. "Effectiveness of cell-free or cell-associated turkey herpesvirus vaccine against Marek's Disease in chickens as influenced by maternal antibody, vaccine dose, and time of exposure to Marek's disease virus". *Avian Disease*. **22**: 583-597 (1978).
3. FONSECA RUIZ, E. Reciente incremento de la enfermedad de Marek en Costa Rica. *Ciencias Veterinarias*. **1**: 44-49 (1979).
4. HEINRICH, B., ZIMMERMANN, P. *Enfermedades de las gallinas*. Trad. de la ed. alemana por E. Strittmatter. Barcelona, Gea. 205-215 (1963).
5. HOFSTAD, M.S., CALNEK, B.W., HELMBOLT, C.F., REID, W.M., YODER, H.W. JR. *Diseases of poultry*. Iowa States University Press, 7a. Edición. 383-418 (1978).
6. KRUSE, PAUL F. JR., PATTERSON, M.K. JR. *Tissue culture methods and applications*. New York: Academic Press. 119-121 (1973).
7. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. "Methods for examining poultry biologics and for identifying and quantifying avian pathogens". Washington: National Academy of Science. **23**. (1971).
8. PRASAD, L.R.M., SPRADBROW. P.B. "Multiplication of turkey herpesvirus and Marek's disease virus in chick embryo skin cell cultures". *Journal of Veterinary Research*. **87**: 515-520 (1971).
9. SOLOMON, J.J., WITTER, R.L., STONE, H.A., CHAMPION, L.R. "Evidence against embryo transmission of Marek's disease virus". *Avian Disease*. **14**: 752-762 (1970).
10. WASSEN, T.H. MOHD, L.D. PATHAK, R.C., SINGH, D.P. "Bioessay of local Marek disease agent in cell culture". *Indian Journal Experimental of Biology*. **14**: 333-336 (1976).