

INOCUIDAD Y ANTIGENICIDAD DE LA CEPA PA-3 DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE MAREK

D.V.M. KAREL A. SCHAT^{1 2}
M.V.Z. JESÚS GONZÁLEZ DEL ÁNGEL²
ALFONSO SOLÓRZANO SILVA²

Resumen

La cepa PA-3 del virus de la enfermedad de Marek (EM), resultó inocua después de haber sido inoculada en pollitos de la raza Leghorn y de la línea Cornell-S con 3,000 y 100,000 unidades formadoras de placa respectivamente.

En las pruebas de potencia, PA-3 protegió al 100% de los pollos vacunados, mientras que el virus Herpes de pavo sólo protegió al 95% en la prueba más favorable. En los pollos controles más del 55% resultaron positivos a la EM.

Pocos años después de que Churchill y Biggs (1967) efectuaron el aislamiento del agente causal de la enfermedad de Marek (EM) se desarrollaron tres tipos de vacunas, de los cuales, en la actualidad, se utilizan principalmente dos.

Una de ellas fue elaborada en Holanda a partir de una cepa apatógena del virus de la EM aislada de gallinas sanas (Rispen *et al.*, 1971 y 1972a), la que confirió una protección excelente en las pruebas de campo (Rispen *et al.*, 1972b). Okazaki, Purchase y Burmester (1970) desarrollaron la otra vacuna, usando una cepa de virus herpes de pavo (VHP) aislada por Witter *et al.* (1970). Subsecuentemente esta última vacuna ha sido usada con buenos resultados, en diferentes pruebas de campo (Purchase, Okazaki y Burmester, 1971; Eidson, Kleven y Anderson, 1972).

Comparando las dos vacunas mencionadas, Rispen *et al.* (1972a) encontraron que en los pollitos inoculados al primer día de edad con vacunas de VHP y desafiados el mismo día, se observó un 95% de protección en los mejores casos, mientras que la vacuna holandesa protegió al 99% de los pollitos, en las mismas condiciones.

Recientemente Okazaki, Purches y Burmester (1973), informaron que la vacuna de

VHP en ocasiones no protege en forma satisfactoria, debido posiblemente a que el virus de campo patógeno de la EM infecta a los pollitos a una edad muy temprana. En la mayoría de las granjas avícolas de México, la infección con cepas patógenas se realiza en los primeros días de edad, cuando los pollitos vacunados aún no han desarrollado buena inmunidad. Por esta razón, se creyó conveniente desarrollar una vacuna a partir de una cepa apatógena del virus de la EM, que de acuerdo con Rispen *et al.* (1972a), ofrece mayor protección.

En 1971, Schat y González aislaron una cepa (PA-3) del virus de la EM en una granja, en la cual no hubo problemas de la EM en sus parvadas anteriores, mientras que en la última parvada se encontró que en el 33% de las gallinas había anticuerpos precipitantes, contra la EM.

En este trabajo se muestran los resultados de los experimentos con pollitos, en donde se investigó la inocuidad de la cepa PA-3, así como la protección conferida por la misma, en comparación con una vacuna elaborada a partir de VHP.

Material y métodos

Cultivos celulares. Se prepararon fibroblastos de embrión de pato (FEPA) siguiendo las técnicas usuales. Los medios de crecimiento y de mantenimiento utilizados fueron los recomendados por Rispen, van Vloten y Maas (1969). Para preparar las células de riñón, se utilizó la técnica de Churchill (1968).

¹ Investigador del Gobierno de los Países Bajos, Departamento de Cooperación Técnica.

² Departamento de Virología del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.G., Apartado Postal 41-652. México 10, D. F.

Virus. La cepa PA-3 fue utilizada en su decimotercer pase en FEPA.

El virus patógeno de la EM usado como cepa de exposición fue aislado a partir de una parvada de aves de 16 semanas de edad, que presentaron tumores en diferentes órganos. Esta cepa, llamada PA-5, ya ha sido probada en su patogenicidad (Solórzano, González y Schat, 1973).

La vacuna VHP fue elaborada con la cepa FC 126 aislada por Witter *et al.* (1970).

En todos los experimentos se intentó reaislar el virus, inoculando sangre de los pollos con FEPA o cultivando las células renales de los pollos inoculados.

Anticuerpos. Para controlar la respuesta al virus, en el primer experimento se buscó la existencia de anticuerpos precipitantes, mediante la técnica de O'kazaki, Purchase y Noll

(1970) con algunas modificaciones (Schat y González, 1971).

Pollitos experimentales. En los primeros dos experimentos de inocuidad se usaron pollitos de raza Leghorn y en un tercero pollitos de la línea Cornell-S, la cual es muy susceptible a la EM (Cole, 1968).

Esta línea fue establecida en nuestro Instituto en 1973, a partir de huevos fértiles, recibidos del doctor R. K. Cole (Cornell University, Ithaca, N. Y.).

Las pruebas de potencia fueron realizadas con pollitas de la línea Babcock. Todos los pollos tuvieron anticuerpos maternos contra la EM.

Diseño experimental de las pruebas de inocuidad. Para investigar la apatogenicidad y el grado de difusión del virus en los pollos, se inocularon por vía intramuscular (I.M.) 93 pollitos con 3,000 unidades formadoras de placa (UFP) de la cepa PA-3. Los pollitos de raza Leghorn fueron mantenidos en una caseta y el mismo día se mezclaron con otros 43 como controles. Entre las 8 y 12 semanas siguientes se efectuaron las necropsias, tanto de los pollos controles como de los inoculados. Semanalmente se colectaron muestras de sangre para detectar la presencia de virus y anticuerpos.

En dos experimentos se investigó a nivel macroscópico y microscópico la presencia de

lesiones de la EM con la cepa PA-3. Para ello, primero se inyectaron I.M. 18 pollitos de raza Leghorn con 3,000 UFP y en el segundo experimento 13 pollitos Cornell-S con 100,000 UFP I. M. Ambos grupos fueron mantenidos en unidades de aislamiento estricto. A diferentes edades los pollos fueron sacrificados, colectando testículos u ovarios, nervios ciáticos y los plexos lumbosacros y branquiales para estudio histopatológico.

Diseño experimental de las pruebas de potencia. En los tres experimentos se vacunaron pollitas raza Babcock de un día de edad con 3,000 UFP de la cepa PA-3 por vía I.M., las cuales fueron mantenidas en aislamiento hasta el momento del desafío.

La exposición se realizó el primer día de vacunación o a los 7, 14 y 21 días por vía parenteral con 15 UFP de la cepa PA-5 o bien por contacto con pollas de 4 semanas, que habían sido inoculadas al primer día de edad con 1,000 UFP de la misma cepa. Este procedimiento se siguió en los dos experimentos, en los cuales se vacunaron pollitas con 2,500 y 3,000 UFP de la vacuna VHP respectivamente. En cada uno de los experimentos, las pollas controles no vacunadas se expusieron con la cepa patógena PA-5 según la técnica utilizada para el desafío de las pollas vacunadas. Las pollas sobrevivientes del primer experimento, se sacrificaron a las 11 semanas de edad y a las 20 semanas en las otras dos pruebas. El número de UFP aplicadas a las aves se comprobó mediante la titulación de cada uno de los virus, después de la inoculación.

Histopatología. Las muestras recolectadas se fijaron en formol al 10%, se incluyeron en parafina y se cortaron con el microtomo a 6 y 7 micras. La tinción se realizó siguiendo las técnicas de hematoxilina-eosina.

Resultados

En ninguna de las aves de los tres experimentos de inocuidad se pudo detectar la presencia de lesiones macroscópicas de la EM. Tampoco a nivel microscópico se encontraron cambios típicos de lesiones de la EM, en los órganos estudiados en ambas razas. Los resultados están en los cuadros 1 y 2.

En el primer experimento en el cual se mezclaron pollos inoculados con pollos controles, de estos últimos se logró el aislamiento del virus y se detectó la presencia de anticuerpos precipitantes, con lo cual se comprobó la difusión de pollo a pollo (Cuadro 1).

Los 40 pollos de la primera prueba de potencia que se vacunaron con 3,000 UFP de la cepa PA-3, resistieron el desafío a diferentes edades con 15 UFP de la cepa PA-5 por vía IM, en cambio en la mayoría de los pollos testigos se observaron lesiones macroscópicas de la EM (Cuadro 3).

En los dos experimentos en los cuales se comprobó la protección conferida por la cepa PA-3 y VHP se observó que esta última protegió al 91% y 94.8% de los pollos respectivamente, mientras que la cepa PA-3 confirió una protección del 100% en ambos experimentos. El desafío se realizó por contacto a diferentes edades con pollas previamente inoculadas con la cepa PA-5, estas pollas se sacrificaron a las 10 semanas de edad presentando lesiones de la EM con 81% y 65% respectivamente.

Todas las pollas no vacunadas que se dejaron como testigos pero que sí fueron desafiadas, se sacrificaron a las 20 semanas de edad, las observaciones a la necropsia indicaron que el 55% y 65% de cada grupo de aves en ambos experimentos tuvieron lesiones típicas de la EM (Cuadro 4).

Discusión

Los experimentos de inocuidad revelaron que la cepa PA-3 es apatógena, aún después de haber sido inoculada en dosis muy elevadas en pollos Cornell-S, genéticamente muy susceptibles a la EM.

La cepa PA-3 tiene la capacidad de difundirse, de pollo a pollo, como otras cepas apatógenas aisladas en el campo (Rispen *et al.*, 1971; Zander *et al.*, 1972), esta característica da oportunidad de usar esta cepa, para vacunar sólo una parte de la parvada tal como se realizó con otras cepas apatógenas en los Estados Unidos (Zander, 1973) y Holanda (Maas *et al.*, 1973).

En las pruebas de potencia en más del 50% de los grupos de pollos controles desafiados por contacto resultaron positivos a la EM, que es el límite mínimo aceptado para la evalua-

ción de la potencia de vacunas con este tipo de exposición.

Los resultados indican que la cepa PA-3 ofrece mayor protección que el VHP, bajo condiciones de desafío, al momento de la vacunación. Por otra parte, cuando se toma en cuenta que el desarrollo de anticuerpos tarda 15 días, la protección del VHP también es satisfactoria.

Una característica general en la avicultura mexicana es mantener aves de diferentes edades en la misma granja y en casetas abiertas, lo que hace como consecuencia que la infección con cepas patógenas se puede realizar a una edad temprana.

Bajo tales condiciones la cepa PA-3 puede ofrecer mejor protección que las vacunas elaboradas a partir de VHP.

Algunos autores piensan que la inducción de interferón por el VHP, es uno de los factores responsables del mecanismo de protección inmediata (Hong y Sevoian, 1971) trabajando con pollos. Kaleta y Bankowski (1972) con pollos y cultivos celulares no lograron detectar la inducción de interferón por el VHP; Schat, González y Solórzano (en prensa) con cultivos celulares tampoco detectaron interferón inducido por las cepas de VHP y PA-3.

Probablemente la protección inmediata se deba a un fenómeno de competencia en las células susceptibles, tanto de las vacunas como de las cepas patógenas (Smith y Calnek, 1974). El virus vacunal tendría ciertas ventajas con respecto a las cepas patógenas, ya que por su método de aplicación, el primero llega más pronto a las células susceptibles.

La cepa PA-3, siendo una cepa homóloga, competiría en forma más efectiva por las células susceptibles que una cepa heteróloga como la VHP.

Summary

The PA-3 strain of Marek's Disease (MD) virus proved to be apathogenic after inoculation of 3,000 and 100,000 plaqueforming units in Leghorn and Cornell-S line chicks.

This strain protected 100% of the chickens against challenge with a pathogenic strain (PA-5) while a herpes virus of turkeys only offered 95% protection in the best experiment.

Nonvaccinated controls were in 55% or more, positive to MD.

Literatura citada

- CHURCHILL, A. E., 1968, Herpes-Type virus isolated in cell culture from tumors chickens Marek's disease. I. Studies in cell culture. *J. Natl. Cancer Inst.*, 41:939-950.
- CHURCHILL, A. E. and P. M. BIGGS, 1967, Agent of Marek's disease tissue culture, *Nature*, 215: 228-530.
- COLE, R. K., 1968, Studies on genetic resistance to Marek's disease, *Avian Dis.*, 12-9-28.
- EIDSON, C. S., S. H. KLEVEN and D. P. ANDERSON, 1972, Vaccination against Marek's disease, Cit. in: *Oncogenesis and herpesviruses*; 147-152, IARC Scientific publications No. 2, Lyon.
- HONG, C. C. and M. SEVOIAN, 1971, Interferon production and host resistance to type II avian (Marek's) leukosis virus (JM strain). *Appl. Microbiol.*, 22:818-820.
- KALETA, E. F. and R. A. BANKOWSKJ, 1972, Production of circulating and cell bound interferon in chickens by type 2 plaque-producing agents of the Cal-1 strain of Marek's disease herpesvirus and herpesvirus of turkeys, *Am. J. Vet. Res.*, 33: 573-577.
- MAAS, H. J. L., B. H. RISPENS, H. N. ANTONISSE and J. E. GROENENDAL, 1973, Comparative results of partial and total Marek's disease vaccination in broiler breeder flocks, *Tijdschr. Diergeneesk.*, 98:319-328.
- OKAZAKI, W., H. G. PURCHASE and B. R. BURMESTER, 1970, Protection against Marek's disease by vaccination with a herpes-virus of turkeys, *Avian Dis.*, 14:413-429.
- OKAZAKI, W., H. G. PURCHASE and B. R. BURMESTER, 1973, Vaccination against Marek's disease: posible causes of failure of herpesviruses of turkeys (strain F.C. 126) to protect chickens against Marek's disease, *Am. J. Vet. Res.*, 34: 813-818.
- OKAZAKI, W., H. G. PURCHASE and L. NOLL, 1970, Effect of different conditions on precipitation in agar between Marek's disease antigen and antibody, *Avian Dis.*, 12:532-537.
- PURCHASE, H. G., W. OKAZAKI and B. R. BURMESTER, 1971, Field trials with the herpesvirus of turkeys (HVT) strain FC126 as a vaccine against Marek's disease. *Poul Sel.*, 50:775-783.
- RISPENS, B. H., J. van VLOTEN and H. J. L. MAAS, 1969, Some virological and serological observations on Marek's disease: a preliminary report, *Brit. Vet. J.*, 125:445-453.
- RISPENS, B. H., K. A. SCHAT, J. van VLOTEN y H. J. L. MAAS, 1971, Investigaciones recientes sobre la enfermedad de Marek en Holanda, *Téc. Pec. Méx.*, 18:74-83.
- RISPENS B. H., J. van VLOTEN, N. MASTENBROEK, H. J. L. MAAS and K. A. SCHAT, 1972a, Control of Marek's disease in the Netherlands. I. Isolation of an avirulent Marek's disease virus (strain CVI 988) and its use in laboratory vaccination trials, *Avian Dis.*, 16:108-125.
- RISPENS, B. H., J. van VLOTEN, N. MASTENBROEK, H. J. L. MAAS and K. A. SCHAT, 1972b, Control of Marek's disease in the Netherlands. II. Field trials on vaccination with an avirulent strain (CVI 988) of Marek's disease virus, *Avian Dis.*, 16-126-138.
- SCHAT, K. A. y J. GONZÁLEZ DEL A., 1971, Informe preliminar de la presencia de anticuerpos precipitantes y aislamiento del virus herpes de la enfermedad de Marek en México, *Téc. Pec. Méx.*, 19:37-40.
- SCHAT, K. A., J. GONZÁLEZ and A. SOLÓRZANO (en prensa), Interferon production by strain of herpesvirus associated with Marek's disease, *Avian Dis.*
- SMITH, M. W. and B. W. CALNEK, 1974, High-virulence Marek's Disease virus infection in chickens previously infected with low-virulence virus, *J. Nat. Canc. Inst.*, 12:1595-1603.
- SOLÓRZANO A., J. GONZÁLEZ y K. A. SCHAT, 1973, Características patogénicas de la cepa PA-5 del virus de la enfermedad de Marek. Resúmenes de la XI Reunión Anual. *Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias*, febrero 1974, México, D. F.
- WITTER, R. L., K. NAZERIAN, H. G. PURCHASE and G. H. BURGOYNE, 1970, Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus, *Am. J. Vet. Res.*, 31:525-538.
- ZANDER, D. V., R. W. HILL, R. G. RAYMOND, R. K. BALCH, R. W. MITCHELL and J. W. DUNNING, 1972, The use of blood from selected chickens as immunizing agent for Marek's disease, *Avian Dis.*, 16:163-178.
- ZANDER, D. V., 1973, Head start and concurrent infection of a small percentage of birds with a naturally occurring mild Marek's disease virus to reduce "Leukosis" condemnations in broilers. Proc. 22nd Western Poultry Disease Conference, March 1973, Davis, California.