

NOTA DE INVESTIGACIÓN

INFORME PRELIMINAR DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS PRECIPITANTES Y AISLAMIENTO DEL VIRUS HERPES DE LA ENFERMEDAD DE MAREK EN MÉXICO

Drs. Karel Antoni Schat 1/
Jesús González del Ángel 2/

Después de los primeros aislamientos del virus de la Enfermedad de Marek (EM) en cultivos celulares (Churchill y Biggs, 1967; Solomón et al. 1968) muchos investigadores han notificado el aislamiento de cepas del virus de la EM, entre otros Rispens, Van Vloten y Maas (1969) en Holanda; Settnes (1970) en Dinamarca y Smith y Conckley (1970) en Australia.

El agente etiológico es un virus asociado a las células que al ser inoculado en monoestratos celulares desarrolla efectos citopáticos típicos; estas dos características sirven como criterio para considerar el aislamiento del virus de la EM (Bankowski, Mikami y Reynolds, 1970).

Chubb y Churchill (1968) señalaron que la técnica de precipitación en agar, es útil para detectar anticuerpos precipitantes contra

Recibido para su publicación el 31 de agosto de 1971.

1/ Investigador del Gobierno de los Países Bajos, asignado al Departamento de Microbiología Experimental, I.N.I.P., S.A.G., Km. 15 1/2 Carretera México-Toluca, Palo Alto, D.F.

2/ Departamento de Microbiología Experimental, I.N.I.P., S.A.G.

3/ Falcon Plastics, Los Angeles, California, U.S.A.

4/ Grand Island Biological Co. (Gibco), Gran Island, N.Y., U.S.A.

5/ BME solución de vitaminas, concentradas 100 veces. Gibco.

6/ Pimafucine, Mycofarm, México.

la EM en los sueros de pollos de parvadas comerciales.

El objetivo de este trabajo fue detectar en México anticuerpos contra la EM mediante la técnica de precipitación en agar gel y el aislamiento del virus de esta enfermedad en cultivos celulares.

Material y métodos

Cultivos celulares;

Para el aislamiento del virus de la EM se utilizaron fibroblastos de embrión de pato. Las células se obtuvieron tripsinizando embriones de pato de 12 días de incubados, (Schat, en prensa 1971). Se cultivaron en cajas de Petri 3/ de 60 x 15 mm a una temperatura de 39°C con 5% de CO₂ y con una humedad aproximada de 95%. Cuando se tenían monoestratos completos, normalmente después de 1 día de incubación, el medio de crecimiento se reemplazó por un medio de mantenimiento.

El medio de crecimiento, compuesto de 450 ml de medio 199 4/, 29 ml de bicarbonato de sodio al 2.1%, 18 ml de suero de ternera 4/, 0.5 ml de solución concentrada de vitaminas 5/. Por cada mililitro de medio se agregaron 500 U.I. de penicilina, 0.5 mg de Estreptomina y 5 µ g de Pimafucine 6/. El medio de mantenimiento compuesto de 200 ml del medio F 10 4/, 160 ml del medio 199, 75 ml de líquido amniótico de bovino 4/, 20 ml de caldo fosfato triptosa, 25 ml de bicarbonato de sodio al 2.1%, así como las mismas cantidades de suero, antibióticos y vitaminas empleadas en el medio de

crecimiento (Rispen, Van Vloten y Maas, 1969).

Preparación del inóculo:

Se colectó sangre de 8-12 aves de las granjas que resultaron positivas a la prueba de precipitación en agar gel, utilizando como anticoagulante citrato de sodio al 3.8%. Las muestras fueron lavadas y centrifugadas con solución salina buferada fosfatada (SBF) con pH 7.6 se decantó el sobrenadante cuidando de no retirar los leucocitos y se inocularon los monoestratos con 1 ml del sedimento.

A las 24 horas de incubación después de la inoculación, los cultivos se lavaron varias veces con la SBF para retirar los restos de sangre y finalmente se agregó el medio de mantenimiento.

Con el fin de continuar el cultivo de los monoestratos, a los 6 y 12 días de incubación se tripsinizaron los cultivos y las células fueron pasadas a otras cajas de Petri con medio de crecimiento; 24 horas después, cuando ya se había formado el monoestrato, el medio de crecimiento fue reemplazado por un medio de mantenimiento.

Colección de los sueros:

Se colectaron 50 sueros de aves de cada granja de reproductoras y se conservaron a una temperatura de -20°C hasta el momento de ser utilizados. Se muestrearon granjas en diferentes zonas del país.

Antígeno utilizado:

El antígeno fue preparado siguiendo la técnica de Chubb y Churchill (1968).

Prueba de precipitación en agar gel.

Se utilizó 1% de agar en una solución buferada de fosfato de sodio y 8% de cloruro de sodio con pH de 7.4, (Okazaki, Purchase y Noll, 1970), con la diferencia de que los diámetros de las perforaciones, fueron de 5 mm y la distancia entre cada perforación también fue de 5 mm. Después de

dos y tres días de incubación a una temperatura aproximada de 20°C, con un alto grado de humedad, las líneas de precipitación fueron observadas utilizando luz natural u otra fuente de luz intensa.

Resultados y Discusión

De los 750 sueros investigados procedentes de 15 granjas de reproductoras con cada uno de los cuales se practicó la prueba de precipitación en agar gel. Los sueros de una granja resultaron negativos a la prueba, en los de las otras 14 se encontraron porcentajes variables de sueros con anticuerpos contra la EM. Con el objeto de saber si los anticuerpos detectados correspondían a cepas patógenas o apatógenas del virus de EM, de cada granja se obtuvieron datos sobre la incidencia de aves con signos de esta enfermedad. (Cuadro 1).

Al colectar sangre citratada de las aves de las granjas 71-1, 71-10 y 71-12 fueron posible aislar virus que produjeron lesiones citopiticas con focos de células refráctiles y células gigantes con abundantes núcleos, estas lesiones típicas son producidas por el virus de la E M, (Solomón et al., 1968). Los virus aislados tienen la característica de estar asociados a las células, ya que cuando se inoculó monoestratos con el medio de cultivo libre de células, procedente de monoestratos afectados, no fue posible reproducirlos.

Los tres agentes aislados, tienen las características del virus Herpes de la EM (Bankowski, Mikami y Reynolds, 1970) y en combinación con la presencia de anticuerpos precipitantes contra la enfermedad, confirman que este virus se encuentra ampliamente distribuido en México.

La presencia de anticuerpos contra la EM en las aves de las granjas, independientemente de la presencia de problemas con esta enfermedad,

CUADRO 1

Relación entre la presencia de anticuerpos y la mortalidad por enfermedad de Marek en granjas reproductoras

Granja	Localización	% de Positivos	Problema de de Marek en la granja
71 - 1	Edo. de México	66	Sí
71 - 2	Sonora	33	No
71 - 3	Sonora	10	No
71 - 4	Jalisco	33	Sí
71 - 5	Edo. de México	0	No
71 - 6	D. F.	11	No
71 - 7	Edo. de México	25	Sí
71 - 8	Edo. de México	62	No
71 - 9	D. F.	33	Sí
71 - 10	D. F.	35	No
71 - 11	Puebla	53	Sí
71 - 12	Puebla	79	Sí
71 - 13	Puebla	77	Sí
71 - 14	Nuevo León	61	No
71 - 15	Nuevo León	58	No

confirman los resultados de Rispens, van Vloten y Maas (1969) en Holanda. Para determinar la patogenicidad de las cepas aisladas, es necesario Inocular en pollitos de un día de edad lo cual será el siguiente paso de este trabajo. Existe la posibilidad de que uno de éstos posea baja patogenicidad, por lo cual se podría utilizar para hacer una vacuna experimental, siguiendo la técnica descrita por Rispens *et al.* (1971). La más prometedora es la cepa PA-3, aislada de la granja 71-10 en la cual se observó la presencia de anticuerpos precipitantes en el 35% de las aves y que además es una granja que no ha tenido problemas de EM.

Agradecimientos:

Se agradece la colaboración del Dr. G. Bijlenga en la realización de este estudio.

Literatura citada

Bankowski, R.A., T. Mikami and B. Reynolds, 1970, The relation between infection of chickens

with Marek's disease and the presence of precipitin antibodies, *Avian Dis.*, 14: 723-737.

Chubb, R.C. and A.E. Churchill, 1968, Precipitating antibodies associated with Marek'disease, *Vet. Rec.*, 83:4-7.

Churchill, A.E. and P.M. Biggs, 1967, Agent of Marek's disease in tissue culture, *Nature.*, 215: 528-530.

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.*, 14:532-537.

Rispens, B.H., J. van Vloten and H.J.L. Maas, 1969, Some virological and serological observations on Marek's disease: a preliminary report, *Br. Vet. J.*, 125: 445-453.

Rispens, B.H., K.A. Schat, J. van Vloten y H.J. Maas, 1971, Investigaciones recientes sobre la enfermedad de Marek en Holanda, *Téc. Pec. en Méx.*, 18: 74-83.

- Settnes, O.P., 1970, Isolation of a herpes-type virus from chickens with acute Marek's disease in Denmark, *Acta. path. Micr. scand* Section B, 78: 495-503.
- Smith, V.W. and W. Conckley, 1970, Isolation of infectiva agents from cases of Marek's disease in poultry, *Aus. Vet. J.*, 46:184.
- Salomón, J.L., R. L. Witter, K. Nazerian and B.R. Burmester, 1968, Studies on the etiology of Marek's disease. I. Propagation of the agent in tissue-culture, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 127: 173-177.