

## AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA ENCEFALOMIELITIS AVIARIA EN MÉXICO

M. V. Z. MARIO A. MARTELL D.<sup>1</sup>

### Resumen

A unos pollitos diagnosticados clínica e histopatológicamente como afectados con encefalomiélitis aviaria, les fue extraído el cerebro. Se hizo una suspensión cerebral inoculando en el saco vitelino embriones susceptibles de 6 días, encontrando las lesiones típicas producidas por el virus de la encefalomiélitis aviaria. Se realizó una prueba de sueroneutralización con antisuero específico utilizando embriones susceptibles: se encontró un índice de neutralización de 2.8.

Se reprodujo la enfermedad inoculando intracerebralmente a pollitos susceptibles, los cuales presentaron el cuadro clínico característico: además se encontraron las lesiones histopatológicas clásicas de la enfermedad en el cerebro, bazo, corazón, páncreas, molleja y proventrículo. Se aisló el virus del cerebro de estos pollitos por inoculación en embriones susceptibles, observando nuevamente las lesiones.

La encefalomiélitis aviaria (EA) (Van Roekel *et al.*, 1938), temblor epidémico o temblor epizootico, es una enfermedad de las aves que afecta en su forma clínica a los pollitos durante la primera semana de vida. En aves adultas suele presentarse en forma subclínica (Guillón, 1961).

Esta enfermedad fue descubierta por Jones (1932) en Nueva Inglaterra. EE. UU., en una parvada de pollitos Rhode Island de dos semanas de edad, desde donde comenzó a extenderse por los estados de la Unión Americana. Se estudió en forma intensiva en el Estado de Massachusetts, donde fue reproducida por inoculación intracerebral en pollitos susceptibles, sospechándose de un virus como posible agente etiológico (Annual Rep. Mass. Exp. Sta., 1936, 1937, 1938, 1940, 1942, 1943). Para la reproducción de la enfermedad se probaron las vías de inoculación: subcutánea, intramuscular, intracerebral e intraocular; observándose que por vía intracerebral se provocaba el 100% de infección (Feibel *et al.*, 1952). Posteriormente la EA ha sido diagnosticada en: Australia. Canadá. Corea, Escocia, Holanda, Inglaterra (Van Roekel, 1959), Francia (Guillón *et al.*, 1961), Japón (Ikeda *et al.*, 1966) e Italia.

En México la EA se diagnosticó por primera vez en 1961 clínica e histopatológicamente (Rivera, 1961). En 1965 más del 20%

de los casos presentados en el Laboratorio de Patología Aviaria de la Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., fueron diagnosticados como EA. basándose en su historia clínica y lesiones histopatológicas (Cuadra, 1966).

En 1966, Correa, del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarías. S.A.G., México, utilizando la cepa Van Roekel del virus de la EA, inició las pruebas de susceptibilidad del embrión de pollo a este virus, basado en las lesiones descritas por Jungherr *et al.*, 1956. Para este trabajo, Correa (1968), utilizó lotes de huevo fértil procedentes de diferentes regiones de la República Mexicana, encontrando un alto porcentaje de resistencia a la enfermedad, por lo que pensó que estaba muy difundida en el país.

Estos antecedentes nos condujeron a llevar a cabo el presente estudio con el fin de aislar e identificar el agente etiológico de esta enfermedad.

### Material y métodos

De 5 pollitos clínicamente afectados por E A se extrajeron los encéfalos. Estos fueron triturados y guardados a menos 70°C. en suspensión al 20% en caldo nutritivo, conteniendo 10.000 U.I. de penicilina y 2 mg. de estreptomycinina por mililitro.

Además, se tomaron muestras de corazón, hígado, páncreas, riñón y proventrículo, las cuales se fijaron en formol al 10% para someterlas a examen histopatológico (en el cual se encontraron lesiones típicas de EA).

Recibido para su publicación el 15 de mayo de 1968.

<sup>1</sup> Depto. de Microbiología Experimental, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarías. S. A. G., México.

Se adquirió un lote de huevo fértil de una granja, que en 4 ocasiones había resultado susceptible a la cepa Van Roekel, de EA, de acuerdo con el método de susceptibilidad del embrión al virus. De la suspensión cerebral de los pollitos afectados, se inoculó 0.1 ml. a 5 embriones susceptibles de 6 días de edad vía saco vitelino. Después de inoculado fueron revisados diariamente con un ovoscopio, desechando los muertos. Los sobrevivientes fueron sacrificados a los 19 días de edad, procediendo así durante 6 pases sucesivos. En cada ocasión se colectaron los cerebros de los embriones afectados y se trituraron, guardándose a menos 70°C. una suspensión al 20% de cada lote.

Con el fin de reproducir la enfermedad con la cepa aislada, 70 pollitos provenientes de la misma granja fueron inoculados intracerebralmente con 0.05 ml. de la suspensión original de encéfalos, diluida al 1:10. Se dejaron 20 pollitos como testigos inoculados con una suspensión al 10% de encéfalo de un pollo aparentemente sano. De los pollos afectados después de la inoculación, se tomaron muestras de hígado, corazón, bazo, riñón, molleja y proventrículo para su examen histopatológico; también se extrajeron cerebros con los cuales se hizo una suspensión al 10% en caldo nutritivo con antibióticos que fue

inoculada a embriones en la forma señalada con anterioridad. La sueroneutralización se efectuó de acuerdo al método B, utilizando huevo fértil procedente de la granja libre de EA. El virus empleado fue una suspensión al 20% de cerebro de embrión en su 6º pase. El suero conocido fue proporcionado por el National Animal Disease Laboratory de Ames, Iowa, EE. UU.

La prueba de sueroneutralización fue hecha abarcando las diluciones de 10-1 a 10-7. Después de mezclar virus con el suero conocido y con caldo nutritivo, se dejaron incubar durante 1 hora y media a temperatura ambiente y se inocularon de 6 a 8 embriones por dilución. Todos los embriones que murieron fueron desechados.

Los títulos obtenidos fueron calculados de acuerdo con el método de Reed y Muench (1938) y los resultados expresados como el antilogaritmo de la dilución.

## Resultados

A los 20 días de la inoculación intracerebral, los pollos comenzaron a manifestar el primer signo de la enfermedad que consistía en ligera ataxia que hacía que se sentaran sobre sus tarsos. Posteriormente esta alteración se acentuaba y seguía una postra-



Fig. 1. Postración en decúbito costolateral de los pollos inoculados intracerebralmente con la cepa aislada

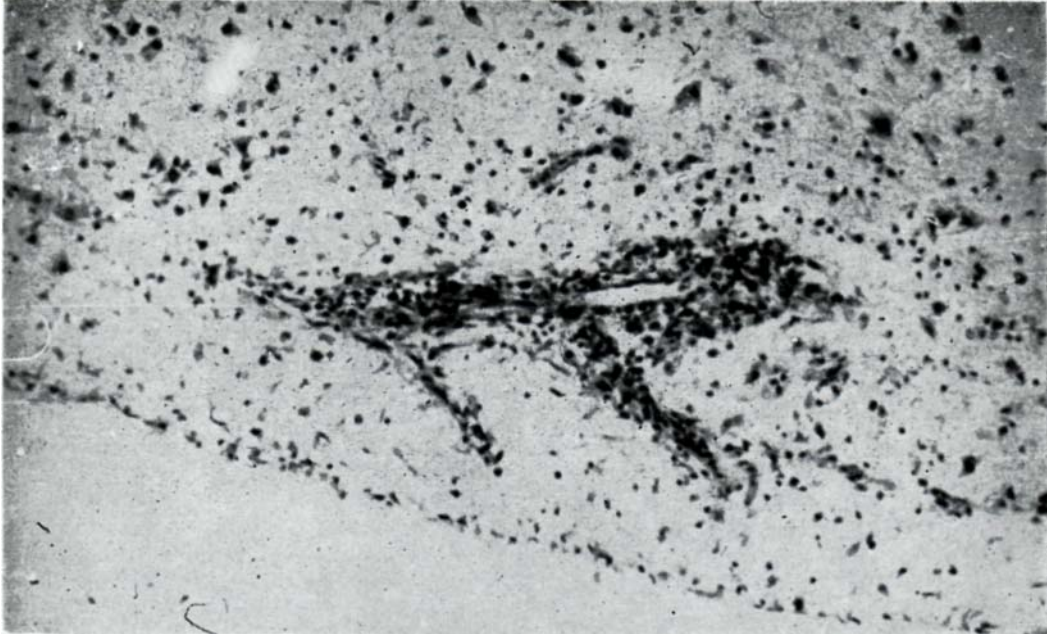


Fig. 2. Infiltración linfocitaria perivascular en encéfalo.

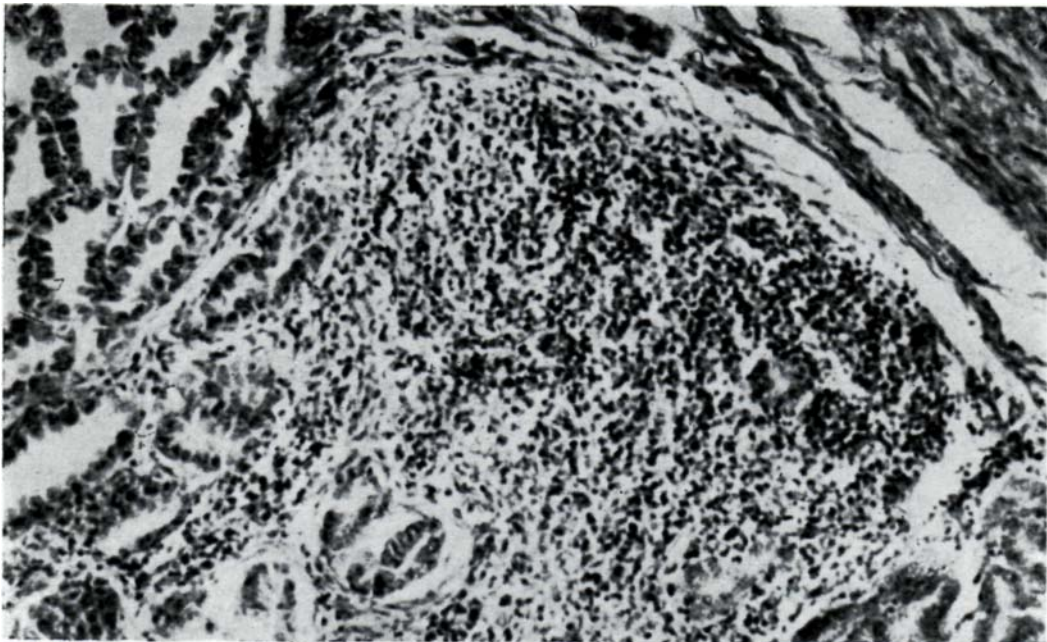


Fig. 3. Hiperplasia linfoide en el proventrículo.



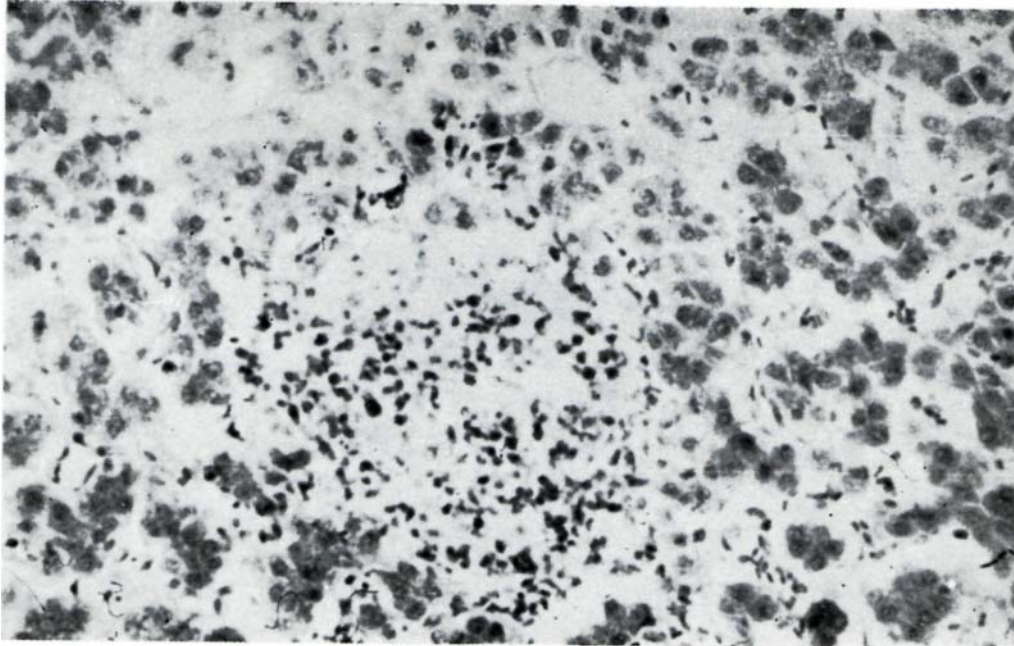


Fig. 4. Hiperplasia linfoide en tejidos hepático



Fig. 5. Infiltración linfocítica entre los hoces musculares de lo fibra cardiaca da las av3s inoculadas.

ción en decúbito costolateral. con espasmos-musculares en cabeza y cuello (Figura 1). La mayoría de las aves afectadas presentaron ataxia, dato que concuerda con el obtenido por Van Roekel en 1959. Algunas de las aves más afectadas se sacrificaron, recolectándose cerebro, riñón, corazón, hígado, molleja, bazo y proventrículo que al examen histopatológico presentaron las lesiones típicas producidas por el virus de la E A (Figuras 2, 3, 4, 5). Ninguno de los animales testigos mostró signos encefalomielíticos durante los 3 meses de observación.

Los embriones inoculados con la suspensión cerebral de los pollos afectados presentaron: parálisis, rigidez, ligero enanismo y distrofia muscular, lesiones descritas como producidas por el virus de la E A (Jungherr *et al.*, 1956).

En el Cuadro 1 se puede observar que la inoculación del virus-caldo dio un título de  $10^{-5,8}$  y que la mezcla virus-suero el título obtenido fue de  $10^{-3}$ , encontrando un índice de sueroneutralización de 2.8.

CUADRO 1

Material dilución	Emb. afectados/sanos	DI 50%
Virus — caldo nutritivo		
10-1	5/5	$10^{-5,8}$
10-2	5/5	
10-3	6/6	
10-4	6/6	
10-5	7/8	
10-6	2/7	
10-7	0/6	
Virus — suero		
10-1	5/5	$10^{-3}$
10-2	5/5	
10-3	3/6	
10-4	0/7	
10-5	0/6	
10-6	0/5	
10-7	0/6	

### Discusión

Todas las aves inoculadas con la suspensión cerebral de los pollos diagnosticados clínica e histopatológicamente afectados con EA, manifestaron signos tales como ataxia, ataxia y espasmos musculares en cabeza y cuello, signos que comprobaron la repro-

ducción clínica de la enfermedad. El resultado del examen histopatológico representó la réplica de las lesiones producidas por el virus en los pollitos enfermos y junto con el reaislamiento del virus a partir de los cerebros de los pollos inoculados, se cumplieron los postulados de Koch.

El resultado de la sueroneutralización representó la caracterización del agente etiológico.

Las características de la cepa aislada difieren de la cepa Van Roekel (VR) en período de incubación; mientras la cepa VR produce la enfermedad por vía intracerebral desde los siete días posteriores a la inoculación (Batalla, 1968) con la cepa aislada en este estudio se observaron los primeros signos a los 20 días, diferencia que puede deberse a la adaptación que tiene la cepa VR después de 120 pases intracerebrales en pollos.

El cuadro clínico de los pollos inoculados con esta cepa, así como el viscerotropismo son similares a lo descrito por Van Roekel (1959). Es evidente que la E A existe en México desde hace tiempo y está bastante difundida. En el laboratorio de Patología Aviaria de la U.N.A.M., se han recibido aves afectadas de EA de los Estados de: Sinaloa, Sonora, Durango, Nuevo León, Tamaulipas, Jalisco, Querétaro, Guanajuato, Estado de México, Morelos, Tlaxcala, Puebla, Guerrero, Hidalgo, Veracruz y Distrito Federal. Esto corrobora la amplia difusión de esta enfermedad en México.

### Conclusiones

El aislamiento del agente etiológico de la encefalomyelitis aviaria en casos de campo, la reproducción de la enfermedad en animales susceptibles, el reaislamiento del virus y la identificación serológica, corroboraron los antecedentes clínicos e histopatológicos comunicados por Rivera y Cuadra y los trabajos de susceptibilidad del embrión de pollo al virus Van Roekel desarrollados por Correa (1968).

### Summary

The diagnosis clinical and histopathological of aviary encephalomyelitis (A E) was made in a flock of chickens. A pool of their

brains was inoculated intracerebrally into other chickens and in these typical clinical and histopathological lesions were found in brain, spleen, gizzard, heart, pancreas and proventriculus. The A E virus was isolated from brain of these chickens.

A serum neutralization test was done, using susceptible chicken embryos and a serum neutralization Index at 2.8 log. was noted.

### Literatura citada

ANNUAL REPORT, 1936. *Mass. Agric. Exp. Sta. Bull* N° 327 p. 75-76.

ANNUAL REPORT, 1937. *Mass. Agric. Exp. Sta. Bull* N° 339 p. 39-90.

ANNUAL UREPORT, 1938. *Mass. Agric. Exp. Sta. Bull* N° 347 p. 32-93.

ANNUAL REPORT, 1940. *Mass. Agric. Exp. Sta. Bull* N° 369 p. 94.

ANNUAL REPOBT, 1942. *Mass. Agric. Exp. Sta. Bull* N° 371 p. 76.

ANNUAL REPORT, 1943. *Mass. Agric. Exp. Sta. Bull* N° 398 p. 58-59.

BATALLA C. D., 1968. Comunicación personal.

CUADRA A., 1966. Comunicación personal.

CORREA P., 1966. Comunicación personal.

CORREA P., 1968. Comunicación personal.

FEIBEL, F.; HELMOBOLT, E. F.; JUNGHER E. L., AND CARSON J. R., 1952. Avian Encephalomyelitis Prevalence Pathogenecity of the Virus, and Breed Susceptibility. *Am. J. Vet. Res.* p. 138-260.

### Agradecimiento

Agradezco al Dr. Alejandro Cuadra el haber proporcionado los pollitos afectados; al Dr. Héctor Carrillo por su ayuda en el estudio histopatológico, al Dr. Antonio Morilla por las fotografías, y a los doctores Eliseo Hernández, Diódoro Batalla y Jorge M. Baer su ayuda y colaboración.

GUILLÓN F., 1961. Avian Encephalomyelitis. En vías de publicación.

IKEDA S. ASAH I. O. AND OKI M., 1966. Outbreaks of avian encephalomyelitis in chicks. Raised in Japan Natn. Inst. Anim. Hlth. Tokyo, p. 127-135.

JONES E. E., 1932. An encephalomyelitis in the chicken. *Science* 76:331.

JUNGHER E.; SUMMER F. AND LUGINBUHL R. E., 1956. Pathology of egg-adapted avian encephalomyelitis. *Science* 124: p. 80-81.

REED M. R. AND MUENCH H., 1938. A sample of estimating fifty percent Endpoints. *Am. Jour. Hyg.* 27-493.

RIVERA C. E., 1961. Reporte clínico e histopatológico de la Encefalomiélitis Aviaria en la República Mexicana. *Tesis Profesional*. U.N.A.M.

VAN ROEKEL H. Avian Encephalomyelitis, 1959. *Disease of Poultry* 4<sup>o</sup> ed. 562-571.

VAN ROEKEL, BULLIS H., AND H. K. CLAREK, 1938. Preliminary report on infectious avian encephalomyelitis *J.A.V.M.A.* 93: 372-375.