

619:616.36:002.-0.22.6:636.597

## Hepatitis vírica del pato

(Comunicación previa)

POR

Dra. ESTELA S. MENCHACA (\*)

### R E S U M E N

Se aísla por primera vez en el país un virus que provoca hepatitis en patos entre la II<sup>a</sup> y III<sup>a</sup> semana de edad con una elevada mortandad.

Se describen las pruebas experimentales: inoculación a embriones de pollo y patos, patitos "BB"; estudio macroscópico y microscópico de las lesiones; estudios que nos permiten a priori suponer que se trata del virus descubierto en los EE.UU. por Levine P. P. y Fabricant J. (12) al que dieron el nombre de "Virus de la Hepatitis del Pato".

### I N T R O D U C C I Ó N

Durante el mes de octubre de 1965, se nos consulta sobre una mortandad en patitos entre los 12 y los 20 días de edad, que presentaban una sintomatología muy particular.

En animales aparentemente sanos, súbitamente aparecían temblores, incoordinación de movimientos, caída lateral, pedaleo, cuello y cabeza en posición dorsal y hacia atrás. Produciéndose la muerte en pocas horas. El cadáver adoptaba, una actitud de marcado opistótono.

El estudio de los síntomas y la observación de las lesiones nos permiten suponer que nos encontramos ante posibles casos de "Hepatitis vírica", enfermedad que fue descrita por primera vez en el año 1950 por Levine P. P. y Fabricant J. (12), en Long Island EE.UU. Posteriormente la detectaron en Norfolk, Inglaterra. Asplin F. D. y Mchauchlan J. D. (1) donde provocó la mortandad del

(\*) Profesora Asociada Cátedra de Enfermedades Infecciosas. Trabajo realizado en el laboratorio de la Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Sección Patología Aviar.

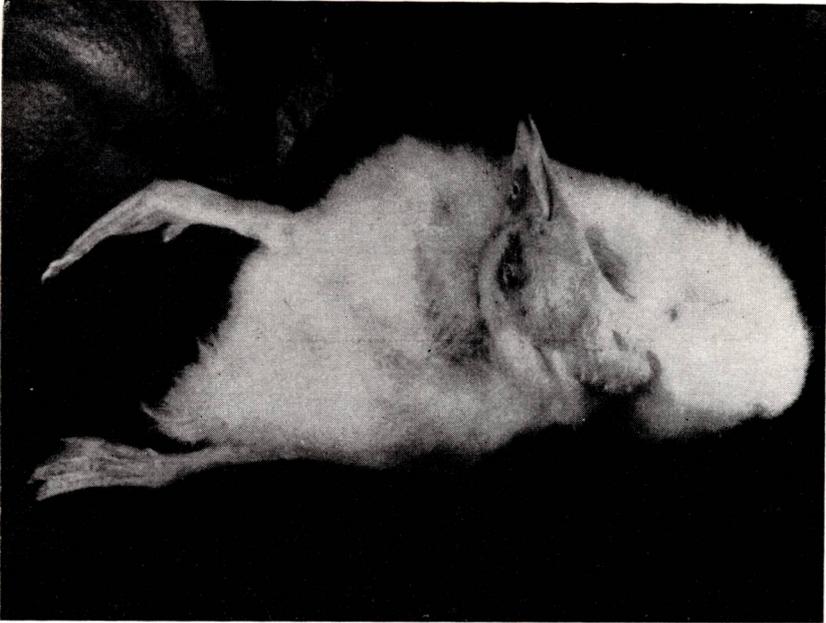


Foto 1 — Patito mostrando la posición de opistótono típica de la enfermedad.

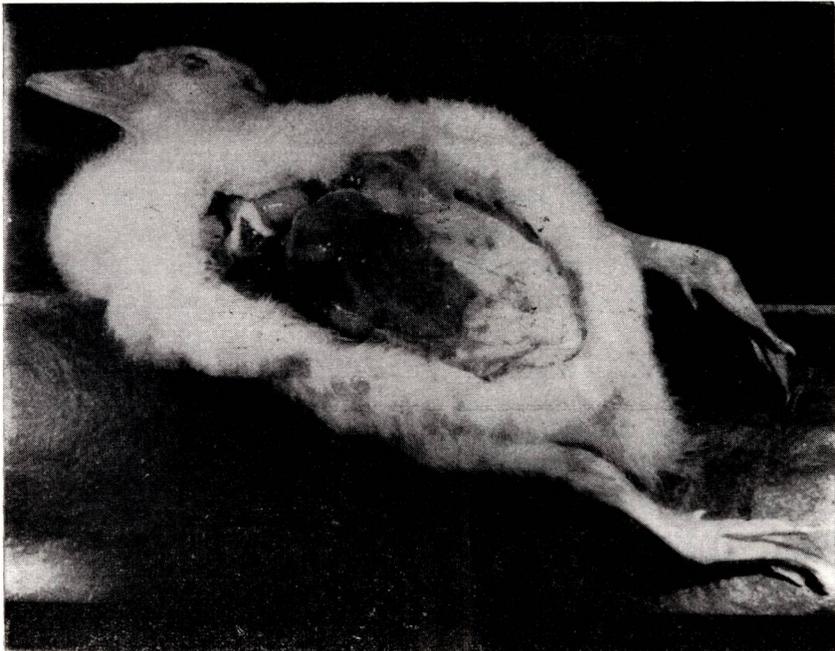


Foto 2 — Patito necropsiado, mostrando su hígado con hemorragias puntiformes.

60 % de los patitos entre la I<sup>a</sup> y II<sup>a</sup> semana de vida. Aparece en el Canadá, Columbia Británica en 1956 en donde es estudiada por Mepher-son L. W. y Avery R. J. (13) en patitos de 10 días, con una mortalidad que osciló entre el 5 y el 40 %. En la misma fecha Hanson L. E. y Alberts J. O. (8) la diagnostican en Massachusette, Illinois y en Michigan, EE.UU. Shehata H. y Reus V. (15) en 1957 la aislan en Alemania y Egipto; Smits W. H. (16) lo hace en Holanda; Schyns P. (17) en Francia. En 1960 Prokof'eva M. T. y Doroshko I. N. (14) en Rusia.

#### MATERIAL Y MÉTODO

*Material*-Criadero con una población de 80.000 animales (8.000 en postura y 62.000 en engorde). Raza criada: Pekín blanco. Mortalidad del 20 %. Morbilidad del 60 %. Edad de los enfermos: entre la II<sup>a</sup> y III<sup>a</sup> semana de vida. Sistema de cría empleado, a galpones sobre piso de cemento. Tratamientos efectuados, muy variados, sin resultados terapéuticos. Total de animales estudiados 71.

*Método. Anatomía patológica.* Se trabajó sobre cortes de hígado, de animales enfermos natural e experimentalmente.

Como fijador se utilizó el formol al 10 %; las técnicas comunes de inclusión en parafina y la coloración con Hematoxilina-eosina y Sudan III.

#### A) Lesiones macroscópicas.

Hígado: Color amarillo-ocre o bien rojizo con petequias y/o sufusiones hemorrágicas. Foto 2 y 3.

Bazo: Ligeramente hipertrófico, algunas veces con petequias hemorrágicas.

Riñones: parénquima pálido. vasos ingurgitados.

Pericarditis: Fibrinosa, fue observada en un solo ejemplar. (Enfermedad natural).

#### B) Lesiones microscópicas.

Hígado: Hiperemia y retención biliar. Cariorrexis y cariolisis de los núcleos de los hepatocitos. Infiltración leucocitaria, degeneración grasa hasta destrucción del parénquima hepático.

#### AISLAMIENTO DEL VIRUS

El aislamiento se hizo a partir del macerado de tres hígados lesionados. Se les trituró finamente y suspendió en la proporción de

1: 4 en solución fisiológica estéril, centrifugado a 2.500 r.p.m. para retener las partículas groseras, se agregó al sobrenadante 10.000 U.I. de penicilina y 5 mg de estreptomicina por cc.



Foto 3 — Hígado con lesiones hemorrágicas.

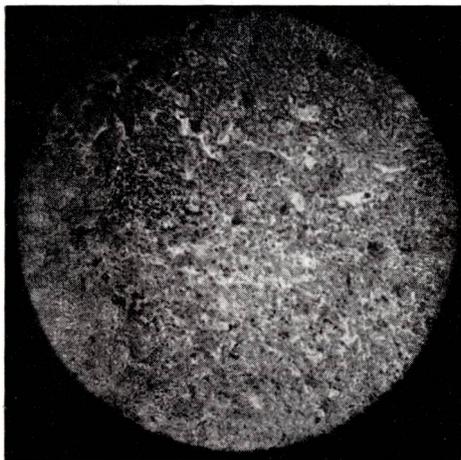


Foto 4 — Corte histológico del hígado.

Dejado media hora a temperatura del laboratorio (18° a 22° C), luego fue inoculado a 8 embriones de pollo de 9 días, previo control

bacteriológico, a la dosis de 0,1 cc, inyectado en la cavidad alantoidea, manteniéndose posteriormente los embriones a 38° C.

Observados periódicamente, mueren a las 144 horas (6 días), con intervalos de 18 hs. dos embriones, se les extrae el líquido alantoideo, con toda esterilidad y se controla frente a globulos rojos lavados de gallina. a los que no aglutina.

Los embriones presentan el dermis congestionado y el hígado hemorrágico. (Tabla N° 1). No se tomaron en cuenta las muertes producidas dentro de las primeras 24 horas.

El estudio de la Tabla N° 1, nos permite observar que el porcentaje de muertes no es del cien por ciento, ni periódica ni regular, hasta el 13° pasaje. Todos los embriones testigos nacieron normalmente.

Continuamos el pasaje a través de embriones de pollo en forma seriada. Los embriones que mueren después del 4° día, muestran lesiones a veces, de edema en miembros y abdomen (1), focos necróticos en hígado o sufusiones hemorrágicas, manchas extendidas o localizadas de color verde oliva.

Sin embargo no es dado observar regularidad en la muerte de los embriones, ni de las lesiones, probablemente por tratarse de escaso número de pasajes, necesitándose, por lo menos 80 pases seriados para lograr una cepa vírica capaz de matar el 100 % de los embriones inoculados. (9).

#### INOCULACIÓN EN PATITOS

Fueron usados patitos de diversas edades, según es posible observar en la Tabla N° 2.

Son mantenidos en observación 20 días después de la inoculación. Mueren en total 18 y sobreviven 6.

Lesiones macroscópicas observadas: Hemorragias hepáticas en 14 animales; bazo ligeramente hipertrofico en 4 animales y lesiones renales en 14 animales. Estas lesiones aparecen en forma alternada en los 18 ejemplares muertos.

En los patitos de un día de edad, el líquido alantoideo de pollo, 2° P (A). demostró tener mayor poder patógeno que el de 1° P pollo.

En los patitos de 2 días de edad, el triturado de hígado de patito de 15 días (enfermedad natural) reveló ser el más eficaz. En tanto que la inoculación en patitos de 7 días de edad, no dió diferencia entre ambos inoculos, en cuanto al total de muertes o aceleración de la misma.

El inoculum utilizado unas veces fue el triturado original de hígados de patitos, enfermedad natural y otras el líquido alantoideo de

TABLA N° 1

Inoculación del Virus de la Hepatitis del pato en embriones de pollo.

N° de embriones	Edad días	Inoculum	Dosis en cc.	Vía	Fecha de muerte días	N° embriones muertos	Observaciones
8	9	Híg. de patito de 15 días	0,1	Cori/alant.	6	2	Híg. hemorrágico 1º P
5	7	1º P	0,1	"	4	3	Em. congest. Híg. hemorrágico 2º P (A)
5	9	1º P	0,1	"	2-3	4	Em. congest. Híg. hemorrágico 2º P (B)
4	10	2º P (B)	0,1	"	4	4	Em. congest. Híg. hemorrágico 3º P (A)
4	10	3º P (A)	0,1	"	2	2	Em. congest. Híg. hemorrágico 4º P (A)
15	10	3º P (A)	0,2	"	2-7	15	Focos necróticos en híg. Em. congest. 4º P (B)
15	10	4º P (A)	0,2	"	2-7	13	Em. congest. Híg. c/sufusiones hemorrág. 5º P (A)
2	14	4º P (B)	0,1	"	5-6	2	Focos necróticos en híg. 5º P (B)
2	10	4º P (B)	0,2	"	2-3	2	Focos necróticos en híg. Edema de miembros. 5º P (C)

4	9	5º P (C)	0,1	"	7-8	3	Híg. verde oliva. 6º P (A) y (B)
4	12	6º P (A)	0,2	"	2-6	4	Híg. verde oliva. Em. congest. 7º P (A)
4	12	6º P (B)	0,2	"	4-7	3	Híg. verde oliva y hemorrág. 7º P (B)
6	10	7º P (B)	0,2	"	2-4	6	Híg. ocre-hemorrág., c/manchas verde oliva 8º P (A) y (B)
3	9	8º P (A)	0,2	"	3-4	2	Híg. hemorrág y m/verde oliva 9º P (A)
1	11	9º P (A)	0,2	"	2	1	Híg. hemorrág. con f/necróticos 10 P (A)
3	14	10º P (A)	0,2	"	5-6	3	Híg. verde oliva 11º P (A)
3	10	10º P (A)	0,2	"	2-4	2	Híg. verde oliva. Em. edematoso 11º P (B)
3	9	11º P (B)	0,2	"	5	2	Em. enano congest. 12º P (A)
3	9	12º P (A)	0,2	"	5	2	Emb. congestionado, híg. hemorrágico. 13º P (A)
5	10	11º P (B)	0,2	"	10	2	Hepatitis 12º P (B)
4	9	12º P (A)	0,2	"	4	2	Emb. enano, hemorrágico, edematoso. 13º P (B)

TABLA N° 2

Inoculación en patitos

N° de patitos	Edad en días	Dosis cc.	Inoculum	Vía	Fecha de muerte en días	N° de patitos muertos con lesiones patognomónicas
2	1	0,2	Liq. alantoideo 2º P (A). Pollo	Intr. Muscular	3-14	2
6	1	0,2	Liq. alantoideo 1º P (pollo)	"	6	3
4	2	0,2	Liq. alantoideo 1º P (pollo)	"	7-19	3
4	2	0,2	Híg. patito de 15 días	"	3-20	4
4	7	0,2	Liq. alantoideo 1º P (pollo)	"	4-15	3
4	7	0,2	Híg. patito de 15 días	"	2-19	3

TABLA N° 3

Inoculación en embriones de pato

N° de embriones	Edad en días	Inoculum	Dosis en cc.	Vía	Fecha de muerte en días	N. de muertos	Pasaje
4	10	Liq. alantoideo 3º P (A) pollo	0,1	Cav/corio alantoidea	2	4	1º P (A) Pato
6	10	Hig. patito de 15 días	0,1	"	2-6	6	1º P (B) Pato
3	15	Liq. alantoideo 1º P (A) pato	0,1	"	2	2	2º P (A) Pato
3	15	Liq. alantoideo 1º P (B) pato	0,1	"	4	3	2º P (B) Pato

los embriones inoculados en sus diversos pasajes a la dosis de 0,2 cc. por vía intramuscular. Los animales murieron en un 58,33 % con los síntomas y lesiones clásicas de la enfermedad, otros mueren sin síntomas, ni lesiones, 16,66 %, y una cantidad de ellos se salva el 15 %.

#### INOCULACIÓN A EMBRIONES DE PATO

Fueron utilizados embriones de pato entre los 10 y los 15 días de edad, Tabla N° 3. Los que mueren entre los 2 y los 6 días, con el hígado congestionado o con petequias hemorrágicas y con los riñones pálidos.

El cuadro N° 3 nos esta indicando que la inoculación del líquido alantoideo de embrión de pollo, 3º P (A); hígado de patito con enfermedad natural y del líquido alantoideo de embrión de pato, 1º P (A) y (B); mata los embriones en términos que oscilan entre los 2 y 6 días.

Estas pruebas, se prosiguen a fin de comprobar si en el embrión de pato las muertes se producen en menor número de días, y además si el virus adquiere regularidad con más rapidez que cuando es cultivado en embriones de pollo (3), (9).

TABLA N° 4

Titulación del virus. Como inoculum se usó el 3º P (A) de embrión de pollo.

Dilución	N.º del embrión	D í a s							
		1	2	3	4	5	6	7	8
10-1	1	—	+						
	2	—	+						
	3	—	+						
10-2	4	—	+						
	5	—	—	+					
	6	—	—	+					
10-3	7	—	+						
	8	—	—	+					
	9	—	—	—	+				
10-4	10	—	—	—	+				
	11	—	—	—	+				
	12	—	—	—	+				
10-5	13	—	+						
	14	—	—	—	+				
	15	—	—	—	+				
Testigo	16	—	—	—	—	—	—	—	—
Testigo	17	—	—	—	—	—	—	—	—
Testigo	18	—	—	—	—	—	—	—	—
Virus	19	—	+						
Virus	20	—	+						

## TITULACIÓN DEL VIRUS

Se prepararon 5 diluciones, siguiendo las directivas del trabajo original (12), sobre caldo (Difco), operándose con diluciones en base 10, con la precaución de utilizar una sola vez las pipetas de doble aforo para cada dilución.

El material se mantuvo siempre en baño de hielo, hasta el momento de su inoculación. Previamente se había hecho el control bacteriológico del inoculum. Cada dilución fue inoculada a tres embriones de pollo de 10 días de edad a la dosis de 0,2 cc. en la cavidad corio-alantoidea.

Los embriones fueron observados diariamente, Tabla N<sup>o</sup> 4. Aquellos inoculados con la dilución  $10^{-4}$  mostraron los focos necróticos en hígado típicos de la enfermedad. (12).

En el cuadro precedente interpretamos que:

1<sup>o</sup> Las primeras muertes del total de los embriones inoculados con una misma dilución  $10^{-1}$  se producen dentro de las 48 horas.

2<sup>o</sup> En las diluciones,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  hay una relación directa entre el aumento de dilución y el tiempo de muerte del embrión.

El título obtenido es de  $10^{-5.5}$ .

*Pruebas serológicas.*

Se trabajó con tres sueros hiperinmunes:

*Suero "A"*: Proveniente de patitos entre los 30 y 40 días de edad, recuperados de la enfermedad natural y mantenidos en el foco infeccioso hasta el momento de su sangría.

*Suero "B"*: Origen, 6 patitos recuperados de pruebas experimentales (Tabla N<sup>o</sup> 2), que recibieron además dos dosis con intervalos de 72 hs., 0,5 cc. de virus (4 P (B) pollo) con un título de  $10^{-5.5}$  por vía intramuscular. Sacrificados 16 días después de la última inoculación.

*Suero "C"*: Enviado por el Dr. W. D. Urban, Director del "Duck Research Laboratory". Con un título protector de  $10^{-6.7}$ .

Primera prueba.

A) Precipitación en gel.

Técnica de Krishna Murty D. y Hanson Lyle E. (11). Como antígeno se utilizó el líquido alantoideo de embriones inoculados e hígado de embriones con lesiones. Sueros tipo: el "A", "B" y "C".

Se hicieron pruebas cruzadas con suero de patos normales y con líquido alantoideo e hígado de embriones normales.

La temperatura usada para observar las bandas de precipitación fue la temperatura del laboratorio, oscilando entre 18<sup>o</sup> y 22<sup>o</sup> C. Las

lecturas se hicieron a las 4 hs. 24 hs. y 48 horas. Notándose una banda de precipitación entre el suero "C" y el macerado de hígado de embrión con lesiones necróticas.

Segunda prueba.

A) Poder protector del suero.

Con el suero de animales recuperados de la enfermedad natural, al que se agregó formol al 4 ‰ (2), (12) se mantuvo a 37° C durante 24 hs, controlándose posteriormente su esterilidad. Se realizaron dos pruebas para comprobar, si los sueros poseían algún poder inmunizante, usados en el foco infeccioso.

1º Fueron inoculados 50 patitos de 7 días de edad, con 1 cc. por vía intramuscular. Dos animales presentaron retraso en el desarrollo. por causas ajenas a la experiencia.

2º 20 patitos reciben a los 4 días de vida 1 cc. de suero, por vía intramuscular; entre los 16 y 17 días posteriores a la inoculación mueren tres animales; pueden interpretarse estas muertes como una cesación de la inmunidad pasiva y el hecho de encontrarse los animales dentro del período de infección natural.

#### DISCUSIÓN

Coincidimos con los resultados citados por Levine P. P. y Fabricant J. (12), en cuanto son necesarios algunos días, cuatro por lo menos, para que sea dado observar los focos necróticos en el hígado del embrión de pollo, así como la coloración verdosa citada por Asplin F. D. y Melauchlan J. D. (1).

El virus aislado por nosotros, en repetidas ocasiones resultó letal para los embriones a las 48 hs. (1), (11), de la descarga en la cavidad corio-alantoidea. Pero su comportamiento resulta ser muy irregular en los pasajes bajos como lo ha demostrado Hwang J. (9).

La particularidad que posee éste virus de no hemoaglutinar los glóbulos rojos de gallina matando al embrión en 48 hs. 72 hs. 96 hs. y hasta 10 días, lo diferencia netamente del virus de Newcastle; su resistencia a la penicilina y estroptomicina lo excluyen del grupo psitacosis, (11).

Los focos necróticos en hígado suelen aparecer ocasionalmente en los embriones inoculados con Bronquitis infecciosa, pero van acompañados de marcado enanismo adoptando el embrión una actitud de enroscado, fenómeno que no sucede con el virus de la hepatitis. Además nunca aparecen embriones edematizados en la B. infecciosa.

Las lesiones congestivas y hemorrágicas que se producen en los embriones de pollo, cuando mueren antes de los cuatro días de la inoculación también han sido citados por Hanson L. E. y Alberts J. O. (8).

Las pruebas de protección en el establecimiento de cría, con el suero de convalecientes demuestra el poder protector en patitos expuestos a un ambiente infectado.

En cuanto al origen de la infección se desconoce; pues no se importaron reproductores ni se introdujeron animales al criadero, con la única excepción de unos pollos híbridos, lo que nos podría llevar a sospechar que las gallinas, en determinadas circunstancias podrían actuar como portadoras accidentales del virus.

Es evidente que en las pruebas de precipitación en gel, el suero hiperinmune enviado por el Dr. W. D. Urban, con un título de  $10^{-6.7}$  actuó frente a órganos embrionarios infectados, dando bandas de precipitación más francas que con los sueros hiperinmunes obtenidos artificialmente y naturalmente por nosotros; posiblemente sea debido a una mayor capacidad antigénica, estudios que se continuaran.

#### CONCLUSIONES

Se aísla un agente vírico que produce una mortandad del 20 % y una morbilidad del 60 % en patitos entre la IIª y IIIª semana de vida.

El aislamiento, pasaje seriado por embrión de pollo y de pato; titulación; inoculación a animales receptivos y demás pruebas de laboratorio, unidos a los síntomas y lesiones anatomopatológicas de los animales naturalmente y experimentalmente enfermos nos confirman el hallazgo en nuestro país, por primera vez, de un virus de la hepatitis del pato.

#### AGRADECIMIENTO

Expresamos nuestro agradecimiento al Dr. W. D. Urban, Director del Duck Research Laboratory, Eastport, N. Y. U.S.A., por el envío del suero hiperinmune de la hepatitis del pato.

Al Dr. Carlos Capelli por su colaboración en la preparación, interpretación de los cortes histopatológicos y fotografías que acompañan el presente trabajo.

## BIBLIOGRAFIA

1. ASPLIN, F. D. y MCLAUCHLAN, J. D. Vet. Record 1954. 66/456.
2. ASPLIN, F. D. Vet. Record 1956. 68/412.
3. BIESTER, H. E. y SCHWARTE, L. D. *Enfermedades de las aves*. Traducción de la 4ª Edición Americana. 1964. "Uteha".
4. FABRICANTS, J. RICKARD, C. G. y LEVINE, P. P. *A preliminary report*. Proc. 27 th Ann. Meet. Northeast Conf. Lab. Workers in Pullorum Disease Control June 14-15 (Cit. por Biester y Schwarte).
5. FABRICANTS, J. RICKARD, C. G. y LEVINE, P. P. Avian Disease 1957. 1/256.
6. FRITZSCHE, K. y GERRIETS, E. *Enfermedad de las aves*. 2ª Edición Alemana 1962. "Acirbia".
7. GUILLÓN, J. C. VALLEÉ, A. y RENAULT, L. Annales de L'Institut Pasteur. 1962. 103/6/921.
8. HANSON, L. E. y ALBERTS, J. O. Jour. Amer. Vet. Ass. 1956. 128/37.
9. HWANG, J. Avian Disease 1965. IX-3/417.
10. JANSEN, J. y KUNST, H. Rep. 14 th Internat. Vet. Cong. London. 949. 2/363.
11. KRISHNA MURTY, D. y HANSON, L. E. Am. J. Vet. Res. 1961. 22/275.
12. LEVINE, P. P. y FABRICANTS, J. Cornell Vet. 1950. 40/71.
13. MACPHERSON, L. W. y AVERY, R. J. Canad. Jour. Comp. Med 1957. 21/26.
14. PROKOFEVA, M. T. y DORÓSHKÓ, L. N. Veterinaria 1960 3. 38/40.
15. SHEHATA, H. y REUSS, V. Deutsche tierärztl Wochensch 1957. 64/27.
16. SMITS, W. H. Tijdschr. v. Diergeneesk 1957. 82/177.
17. SCHYNS, P. Ann. Med. 1957. 101. 4. 264/271.