

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA.**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL.**



**“ENFERMEDAD DE MAREK EN LOS ULTIMOS DIEZ AÑOS”**

**POR:**

**ROBERTO MUÑOZ GRIMALDO.**

**MONOGRAFÍA.**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA.**

**TORREÓN, COAHUILA**

**JUNIO DE 2010**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA.**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL.**



**“ENFERMEDAD DE MAREK EN LOS ULTIMOS DIEZ AÑOS”**

**POR:**

**ROBERTO MUÑOZ GRIMALDO.**

**ASESOR.**

**MC. JOSÉ MONCEBÁEZ Y PÉREZ.**

**COLABORADOR:**

**M.V.Z. FELIPE GUILLERMO VILLALOBOS GUERRERO.**

**MONOGRAFÍA.**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA.**

**TORREÓN, COAHUILA**

**JUNIO DE 2010**

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA.  
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL.



**“ENFERMEDAD DE MAREK EN LOS ULTIMOS DIEZ AÑOS”**

**MONOGRAFÍA.**

APROBADA POR EL COMITÉ

PRESIDENTE DEL JURADO.

  
\_\_\_\_\_  
MC. JOSÉ MONCEBÁEZ Y PÉREZ.

COLABORADOR.

  
\_\_\_\_\_  
MVZ. FELIPE GUILLERMO VILLALOBOS GUERRERO.

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL  
DE CIENCIA ANIMAL.

  
\_\_\_\_\_  
M.V.Z. ROGRIGO ISIDRO SIMÓN ALONSO



**Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal**

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA.

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL.

“ENFERMEDAD DE MAREK EN LOS ULTIMOS 10 AÑOS”

---

MC. JOSÉ MONCEBÁEZ Y PÉREZ.

PRESIDENTE

---

MVZ. JESÚS ALFONSO AMAYA GONZÁLEZ

VOCAL

---

MVZ. JESÚS GAETA COVARRUBIAS

VOCAL

---

MC. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA

VOCAL SUPLENTE.

TORREÓN, COAHUILA

JUNIO 2010

## **DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS.**

Agradezco a mi Dios por ser mi mejor amigo y mi fortaleza espiritual.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y a todos sus catedráticos por sus enseñanzas.

Al MC. JOSÉ MONCEBÁEZ Y PÉREZ por asesorarme a lo largo de la monografía y guiarme en este camino que hoy culmina en el presente proyecto, por compartir su conocimiento, tiempo y dedicación.

Al M.V.Z. Felipe Guillermo Villalobos Guerrero, por orientarme lo largo de la monografía, por darme la oportunidad de realizar mis Prácticas Profesionales. Brindándome desinteresadamente su amistad y su conocimiento.

A mis padres, Roberto Muñoz Rodríguez y Lilia Grimaldo Pérez, por ser los mejores padres para mí, por todos los sacrificios y esfuerzos que tuvieron que hacer desde mi infancia hasta la formación profesional. Por su apoyo, consejos, palabras de aliento, paciencia, noches de desvelos y oraciones.

Agradezco y dedico este trabajo como muestra palpable de todo su amor.

A mis hermanos Juan Salvador Muñoz Grimaldo y Liliana Muñoz Grimaldo, por todo su cariño, fe, comprensión, apoyo y mucha paciencia. Por todo lo bueno que ellos representan para mí, por ser los mejores hermanos los quiero.

Al primer fruto del árbol familiar, Leonardo Muñoz López, con su inocencia y pureza nos hace felices de tenerlo entre nuestros brazos.

A la CP. Judith Grimaldo Pérez. Por su invaluable apoyo tanto moral como económico, por ser tan clara y firme conmigo en el momento preciso, por toda su confianza. Por dedicarme su tiempo para escucharme después de un arduo día de trabajo. Gracias tía madrina por tu gran apoyo.

A la Srita, Azucena Carlos Vázquez. Por estos años que me ha brindado mucho amor, cariño, comprensión y paciencia. Por ser mi presente, mi futuro, mi compañera y amiga gracias por ser parte esencial de mi vida.

A todos mis familiares, que con su alegría, cariño y unión nutren mis valores y tradiciones.

A amigos y personas que formaron y forman parte de mi vida y a las que ayudaron a mi formación, y crecimiento como personal.

A todos mi eterna gratitud.

## CONTENIDO

Dedicatoria y agradecimientos	I
Índice	II
Índice de figuras	VII
Índice de cuadros	IX
Resumen	X
Palabras claves	X
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2.- HISTORIA</b>	<b>3</b>
<b>3.- INCIDENCIA Y DISTRIBUCIÓN</b>	<b>6</b>
<b>4.- IMPORTANCIA ECONÓMICA</b>	<b>7</b>
<b>5.- RELEVANCIA CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA</b>	<b>8</b>
<b>6. - SITUACIÓN ACTUAL</b>	<b>9</b>
<b>7.- ETIOLOGIA</b>	<b>9</b>
7.1-Clasificacion	9
	10
<b>8.- MORFOLOGÍA Y MORFOGENÉSIS</b>	<b>11</b>
8.1.- Propiedades físicas	12
8.2.- Organización estructura	12
8.3.- Genes virales y antígenos	14
8.4.- Genes de glucoproteínas	18
8.5.- Otros genes	19
8.6.- Vectores virales	20
8.7.- Recombinación y mutación	20
8.8.- Replicación viral	21
8.9.- Tipos generales de interacción	21
8.9.1.- Infección productiva	22
8.9.2.- Infección latente	23
8.9.3.- Infección transformadora	24
8.9.4.- Integración del DNA viral	26
8.10.- Diferencias entre los serotipos	26
<b>9.- ESTABILIDAD Y DESINFECCIÓN</b>	<b>27</b>

<b>10.- CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS</b>	28
10.1.- Serotipos	28
10.2.- Patotipos	29
<b>11.- SISTEMA DE HUÉSPED DE LABORATORIO</b>	31
11.1.- Pollos	31
11.2.- Cultivos celulares	31
11.3.- Embriones	33
11.4.- Líneas celulares linfoblastoides	34
<b>12.- EPIZOOTIOLOGIA</b>	36
12.1.- Distribución de la enfermedad	36
12.2.- Transmisión	37
<b>13.- FACTORES PREDISPONENTES DEL HUÉSPED.</b>	38
13.1.- Edad y sexo	38
13.2.- Anticuerpos maternos	39
13.3.- Constitución genética	39
13.4.- Factores predisponentes del virus	40
13.5.- Factores predisponentes del ambiente	40
13.5.1.- El estado de tensión	40
13.5.2. Asociación con otras enfermedades	40
13.5.3. Alimentación	41
<b>14.- PERIODO DE INCUBACIÓN</b>	41
<b>15.- PATOGENIA</b>	42
15.1.- Infección productiva y restrictiva	42
15.2.- Infección latente	45
15.3.- Infección transformante	45
<b>16.- SIGNOS</b>	49
<b>17.- MORBILIDAD Y MORTALIDAD</b>	51
<b>18.- HALLAZGOS MACROSCÓPICOS</b>	55
18.1.- Presentación cutánea	55
18.2.- Presentación visceral	56
18.3.- Presentación muscular	57
18.4.- Presentación ocular	57

18.5.- Presentación neural	58
<b>19.- HALLAZGOS HISTOLÓGICOS</b>	<b>59</b>
19.1.- Lesión tipo A	60
19.2.- Lesión tipo B	60
19.3.- Lesión tipo C	60
<b>20.- PATOGÉNESIS</b>	<b>62</b>
<b>21.- INMUNIDAD</b>	<b>68</b>
21.1.- Inmunosupresión	68
21.2.- Respuesta inmunitaria	70
21.3.- Inmunidad humoral	70
21.4.- Inmunidad mediada por células	71
21.5.- Inmunidad por vacunas	73
21.6.- Otros mecanismos de resistencia	74
<b>22.- DIAGNÓSTICO</b>	<b>75</b>
<b>23.- DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL</b>	<b>77</b>
<b>24.- MONITOREO Y PROGRAMA</b>	<b>80</b>
24.1.- Serología	
24.2.- Necropsias	80
24.3.- Histopatología	80
<b>25.- TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO</b>	<b>82</b>
25.1.- Identificación del agente	82
25.2.- Reacción en cadena de la polimerasa	83
<b>26.- PRUEBAS SEROLÓGICAS</b>	<b>84</b>
26.1.- Inmunodifusión en medio sólido	84
26.2. Otras pruebas	86
<b>27.- TRATAMIENTO</b>	<b>87</b>



<b>28.- PREVENCIÓN Y CONTROL</b>	87
28.1.- Vacunas contra la enfermedad de Marek	87
28.1.1.- Vacunas con el serotipo 1 atenuado	88
28.1.2.- Vacunas con el serotipo 2	88
28.1.3.- Vacunas con el serotipo 3	89
28.2. - Vacunas polivalentes	89
28.3.- Vacunas recombinantes	89
<b>29.- TIPOS DE VACUNAS</b>	90
29.1.- Vacunas asociadas a células	90
29.2.- Vacunas libres de células	91
<b>30.- ADMINISTRACIÓN DE LA VACUNA DE MAREK</b>	91
30.1.- Al nacimiento	91
30.2.- Vacunación <i>in ovo</i>	93
<b>31.- REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO</b>	94
31.1.- Control del inóculo	94
31.1.1.- Características del inóculo	94
31.2.- Método de cultivo	96
31.3.- Validación como vacuna	96
<b>32.- METODO DE FABRICACIÓN</b>	99
32.1.- Control interno	100
32.2.- Control de lotes	100
32.2.1.- Identidad	100
32.2.2.- Inocuidad y esterilidad	101
32.2.3.- Potencia	101
32.2.4.- Duración de la inmunidad	102
32.2.5.- Estabilidad	102
32.2.6. Conservantes	102
32.3. Precauciones	102
<b>33.- NORMAS DE ALMACENAMIENTO Y PREPARACIÓN DE LAS VACUNAS CONGELADAS</b>	103
33.1.- Precauciones durante el almacenamiento	103
33.2.- Precauciones antes de empezar la reconstitución	103
33.3.- Recomendaciones para la preparación de la suspensión vacunal	103

<b>34.- BIOSEGURIDAD</b>	105
<b>35.- CONCLUSION</b>	105
<b>36.- BIBLIOGRAFÍA</b>	106

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Historia de la virulencia y decomiso	5
<b>Figura 2.</b> Micrografías electrónicas de MDV y HVT	12
<b>Figura 3.</b> Diagrama estructural de los genomas de los tres serotipos. del virus de la enfermedad de Marek	13
<b>Figura 4.</b> Lesiones focales en células cultivadas infectadas con varios serotipos de MDV	32
<b>Figura 5.</b> MCA de embrión de pollo de 19 días de edad inoculado por el saco vitelino a los cuatro días con sangre de pollos infectados con aislamiento JM	34
<b>Figura 6.</b> Frotis de la línea celular MDCC-RP1	35
<b>Figura 7.</b> Inflamación de los folículos	43
<b>Figura 8.</b> La bolsa de Fabricio	44
<b>Figura 9.</b> Comparación de un bazo normal y un bazo afectado	44
<b>Figura 10.</b> Infiltración de la enfermedad de Marek de los ojos	45
<b>Figura 11.</b> Patogenia de la enfermedad de Marek	46
<b>Figura 12.</b> Daño en el musculo del cuello y paresia unilateral de las patas	49
<b>Figura 13.</b> Aves con la enfermedad de Marek pueden presentar diarrea	50
<b>Figura 14.</b> Decomisos en EUA, en pollos de engorda	52
<b>Figura 15.</b> Folículos de la pluma	55
<b>Figura 16.</b> Linfomatosis visceral	56
<b>Figura 17.</b> Lesión ocular	57
<b>Figura 18.</b> Linfomatosis neural	58
<b>Figura 19.</b> Infiltración de células mononucleares en nervio	59

<b>Figura 20.</b> Tipos de lesiones histológicas en nervio	60
<b>Figura 21.</b> Vacunación al primer día de vida	92
<b>Figura 22.</b> Maquina de vacunación	93
<b>Figura 23.</b> Maquina vacunadora de línea completa	94

## INDICE DE CUADROS.

<b>Cuadro 1.</b> Genes y productos génicos importantes	14
<b>Cuadro 2.</b> Criterios patológicos, virológicos y serológicos utilizados para el diagnóstico diferencial de los linfomas virales en la gallina	78
<b>Cuadro 3.</b> Reacción de anticuerpos monoclonales	78
<b>Cuadro 4.</b> Programa de toma de muestra	81

## **Resumen.**

La enfermedad de Marek es causada por un virus herpes oncogénico altamente contagioso asociado a celular. El presente cubre los puntos más importantes de la enfermedad de Marek, causante de importantes problemas en todo el mundo. A pesar de que existen diversos tipos de vacunación para disminuir los daños causados por esta enfermedad, existen cepas altamente virulentas que pueden evadir esta protección. La búsqueda de vacunas mejoradas que se adelanten a cambios de los virus de campo continuarán pero no se debe confiar solamente en la vacunación. La resistencia genética, un mayor conocimiento del virus y del sistema inmune del ave pueden ser lavase de prevención de esta enfermedad.

Palabras claves: **ENFERMEDAD DE MAREK, ENFERMEDADES LINFOPROLIFERTIVAS, LINFOMAS, ALPHASHERPESVIRUS, RESISTENCIA GENETICA.**

## 1. INTRODUCCIÓN.

La enfermedad de Marek (E.M.) es hoy en día, además de la entidad patológica más destacada del grupo de las neoplasias transmisibles animales, el proceso patológico de mayor preocupación e interés de la patología infecciosa aviar. La detallada descripción de la enfermedad efectuada a principio de la década de los 90, sigue manteniéndose válida en líneas generales. Sin embargo, últimamente se vienen observando unas modificaciones en la presentación habitual de esta enfermedad, en el campo, que han suscitado algunas hipótesis sobre posibles cambios o evolución biológica del virus de Marek.

La enfermedad de Marek es característica de pollos jóvenes; sin embargo, se ve observa en pollos adultos. La Enfermedad de Marek es producida por un herpesvirus que contiene guanina y citosina que pertenece al grupo de los virus del herpes B que esta conformado por un citomegalovirus predominante, se caracteriza por causar infiltrado linfoide neoplásico, tiene cinco presentaciones, dependiendo del tejido que afecte: nerviosa, visceral, ocular, cutánea y muscular. Su importancia económica radica en su capacidad inmunodepresora, ya que el virus de la EM (VEM) al infectar inicialmente a los linfocitos B (LB) y posteriormente a los linfocitos T (LT), impide su actividad biológica y produce su lisis, ya sea por apoptosis o necrosis. Otras pérdidas económicas se producen por decomisos en la planta de procesamiento y desechos por pollos retrasados.

La enfermedad de Marek (EM), parálisis de las patas o de las alas y por una difusión rápida en la parvada. Su importancia económica es considerable; en los Estados Unidos de Norteamérica se ha establecido que hay una pérdida anual de 150 millones de dólares.

En años recientes se ha incrementado la incidencia de trastornos neoplásicos de carácter linfoproliferativo en las aves comerciales. Este aumento se ha encontrado en todos los estados de la Republica Mexicana, así como en los países que cuentan con avicultura tecnificada. La enfermedad linfoproliferativa más común en estas aves es la enfermedad de Marek (EM). La EM es producida por un herpesvirus y se caracteriza por causar infiltrado linfoide neoplásico, tiene cinco presentaciones, dependiendo del tejido que afecte: nerviosa, visceral, ocular.

Su importancia económica radica en su capacidad inmunodepresora, ya que el virus de la EM (VEM) al infectar inicialmente a los linfocitos B (LB) y posteriormente a los linfocitos T (LT), impide su actividad biológica y produce su lisis, ya sea por apoptosis o necrosis. Otras pérdidas económicas se producen por decomisos de la planta de procesamiento y desecho por pollos retrasados. Aunque las cepas del VEM no causan gran mortalidad, actualmente se ha informado de cepas más virulentas que producen alta mortalidad. La inmunodepresión predispone a gran variedad de enfermedades secundarias que también ocasionan mortalidad y pollos retrasados.



## 2. HISTORIA.

En 1907, József Marek describió por primera vez en Hungría una enfermedad en las aves caracterizadas clínicamente por parálisis de las alas y ocasionalmente de la molleja. Después se confirmó la existencia de este cuadro en diferentes países del mundo, como en Holanda, Estados Unidos y Japón. Además de las lesiones descritas se menciona que en ciertos números de los casos también se encontraron tumores linfoides en los ovarios.

En 1941, se inició la confusión sobre el concepto que se tenía de la Enfermedad de Marek (EM), ya que en esa época no se distinguía de la leucosis, otra enfermedad tumoral de las aves, que según Jungherr (1941) era causada por el mismo agente. La confusión aumentó después de una enfermedad con tumores en las vísceras, piel y músculo en combinación que dieron en llamar linfomatosis visceral y que ocurre en pollos más jóvenes que los afectados por leucosis aviar.

Subsecuentemente muchos autores hicieron diferentes cuadros de clasificación de las enfermedades tumorales de las aves, notándose claramente una divergencia de conceptos. El primer grupo, entre ellos Sevoian (1967) decía que las dos enfermedades, la leucosis aviar y la enfermedad de Marek, tenía la misma etiología. El segundo pensó que existían dos etiologías diferentes, entre los que se encontraba Biggs (1961), quien propuso nombrar este padecimiento enfermedad de Marek.

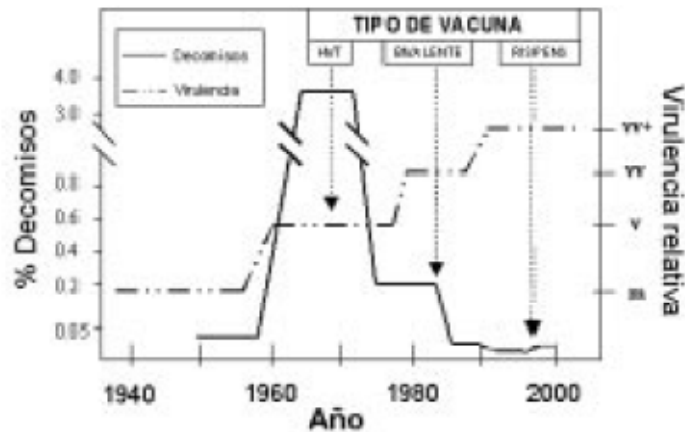
Posteriormente dominó como EM clásica a aquella que produce parálisis, como EM aguda a la enfermedad reportada por Benton y Cover (1957).

Pappenheimer (1963) describió la epidemiología, signos clínicos y algunas lesiones características. Encontró que los linfomas viscerales podrían acompañar a la enfermedad neural, por lo que introdujo el término neurlinfomatosis gallinarum. En la década de los 30, aunado al

desarrollo de la avicultura intensiva, la EM fue diagnosticada mundialmente. Mientras que en 1935 se confirmó que el agente infeccioso circulaba en la sangre de los pollos paralizados por la EM, y además observo que el factor causal estaba ligado al paquete celular sanguíneo y se neutralizaba con la desecación.

Hasta 1959, cuando el Departamento de Agricultura de los EUA implantó la inspección federal de la carne de pollo, se inició la estadística de los decomisos en la planta de procesamiento. Durante la década de los 60, las estadísticas documentaron un importante aumento en los decomisos por el complejo de leucosis aviar. Este complejo comprendía la leucosis cutánea, la leucosis aguda y el ojo gris (términos empleados para la EM).

Este incremento ocurrió primero en la región de Delmarva, al este de los EUA; sin embargo, se diseminó rápidamente a otras regiones. La mayor incidencia registrada de esta enfermedad fue en 1970, cuando las pérdidas por decomisos sobrepasaron 4%, en algunos estados de EUA (Figura 1). Este aumento en los decomisos se atribuyó a que el VEM se tornó de casi a virulento (m, por la sigla en inglés de *mild*) a virulento (v). Sin embargo, debido a la introducción de las vacunas contra VEM la incidencia de decomisos por esta enfermedad ha bajado a niveles inferiores al 0.05%.



**Figura 1.** Historia de la virulencia y decompósitos producidos por el virus de la enfermedad de Marek y su relación con el surgimiento de las vacunas.

La primera vacuna que se usó, con base en el herpesvirus de pavo (HVT por las siglas en inglés de *herpesvirus of turkey*), el uso de esta vacuna se inició en 1969 con la cepa FC126, y se logró abatir rápidamente el porcentaje de decompósitos, de más del 3% al 0.2% en 6 años. Sin embargo, en 1977 surgió un virus de mayor virulencia llamado muy virulento (vv, por sus siglas en inglés), por lo que en 1983 se utilizó una vacuna bivalente con la que se logró controlar el virus vv.

La vacuna bivalente estaba formada por la cepa avirulenta SB1 del sero grupo II del herpesvirus aviar, en combinación con la cepa HVT. Esta vacuna logró bajar el número de decompósitos hasta 0.02%. En 1995, apareció en Norteamérica un virus aún más virulento, denominado muy virulento plus (vv+, por sus siglas en inglés), con lo que aumentan los decompósitos hasta 0.04%, además de aumentar la mortalidad y retrasos en las granjas de pollo de engorda, factores que tienen gran impacto en los costos de producción. Para tratar de controlar esta nueva presentación viral, se está empleando la cepa levemente virulenta Rispens, perteneciente al serogrupo I del herpesvirus aviar. Barrow (1999), caracterizaron tres aislamientos del VEM vv+,

comparando la secuencia de MEQ y de los genes ICP4, debido a que estos últimos fueron similares en todos los aislamientos, asocian el orden de las proteínas ICP4 con las características de virulencia.

### **3. INCIDENCIA Y DISTRIBUCIÓN.**

La EM existe en países productores de aves en todo el mundo, de acuerdo con la revisión de Purchase (1985). Muy probablemente, toda cría de pollos efectuada en áreas en las cuales prevalecen las aves de corral experimentan cierta pérdida, pero los sistemas de información varían y es difícil determinar la incidencia verdadera.

En EUA, la incidencia previa a la disponibilidad de las vacunas no era uniforme, en gran parte debido a los brotes repetidos, agudos, explosivos, en ciertas zonas geográficas. Las pérdidas eran en especial elevadas en áreas en donde era intensiva la crianza de aves de corral (pollos de engorda). Es probable que estas áreas continúen teniendo un riesgo mayor aún con la vacunación.

Esta distribución irregular puede representar la existencia de una forma más virulenta de la enfermedad, que puede presentarse de modo epizoótico en ciertas zonas. Varios informes dan crédito a la implicación de aislamientos MDV (Marek Disease virus), excepcionalmente virulentos en las fallas vacúnales en ciertas granjas o en algunas aéreas.

Purchase *et al*, notó que hay una incidencia estacional en pollos de engorda con pérdidas más altas durante los meses de invierno, supuestamente a causa de una disminución en la circulación de aire. Los datos acerca de decomisos provenientes de la USDA, ofrecen la información

más definitiva acerca de la incidencia variable e inconsistente de la enfermedad dentro y entre zonas.

#### **4. IMPORTANCIA ECONÓMICA.**

La E.M. puede calificarse como la enfermedad de las aves con mayor significación económica a nivel mundial. Aunque la E.M. no ocasiona en la actualidad unas pérdidas económicas de tanta envergadura como las que producía antes de la disponibilidad de las primeras vacunas, siguen siendo considerables, con una inflexión alcista desde el comienzo de este decenio e indudablemente superiores a las ocasionadas por cualquiera otra enfermedad de las gallinas.

En las aptitudes de producción de huevos para el consumo o para la reproducción, los índices de valoración de pérdidas son la mortalidad, la disminución de puesta, el coste de la vacunación contra la E.M. (precio, gastos de conservación, mano de obra, etc.) y la interferencia en los programas productivos. Este último parámetro es probablemente el más relevante en el conjunto de la gestión, pues acarrea pérdidas por desaprovechamiento de las instalaciones y de la mano de obra y sobre todo el incumplimiento de los compromisos comerciales contratados, con pérdida de la cuota de mercado. En la producción de pollos de engorde, se contabilizan la mortalidad y la disminución del rendimiento del lote. Pero el gran capítulo de este segmento de la producción cárnica radica en los decomisos de canales en el matadero por la presencia de lesiones de tipo linfomatoso en la piel y masas musculares, principalmente las de pechuga que son las de mayor valor comercial.

Una causa general de quebranto económico es la derivada del estado de inmunosupresión. Esta disfunción del sistema inmunológico propicia un aumento de la susceptibilidad a otras

enfermedades con la subsiguiente pérdida económica, aunque la extensión de ese daño es complicada de establecer con evidencia en las condiciones de campo.

La variedad y características de las causas directas e indirectas que configuran el quebranto económico de la E.M. Hacen difícil la cuantificación real del coste que afecta a la economía agraria.

## **5. RELEVANCIA CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA**

La importancia de la E.M. se ve acrecentada, además de ser un factor limitante de un sector productor de alimentos para el hombre, por constituir un prototipo para la investigación en diversas parcelas de la biología básica y la medicina.

En el campo de la oncología comparativa, los avances científicos conseguidos con el virus de Marek son un punto de partida para el progreso posterior con los Herpesvirus oncogénicos de los mamíferos, pues la variedad y extensión de la respuesta celular a los diferentes patotipos del virus de la E.M. proporciona una oportunidad para el estudio de la interacción virus-célula en las neoplasias. Otra parcela de especial interés es la estrecha similitud encontrada entre las lesiones de la aterosclerosis humana y las que aparecen en los pollos infectados por el virus de Marek, caracterizadas por la presencia de ateromas y cambios peculiares en la íntima y en la media en arterias coronarias, aorta, celíaca, etc. y que abren unas expectativas como modelo científico para el estudio de la patogenia de la aterosclerosis.

## **6. SITUACIÓN ACTUAL.**

Actualmente en el resto de los países hay tres razones que aislada o conjuntamente, respaldan la opinión de que la E.M. es el problema prominente de la patología aviar. Una, la percepción de que la virulencia del virus de Marek se ha incrementado. Otra, la impresión de que las vacunas en uso no están actuando con la eficacia que demostraban en el pasado y la tercera, el sentimiento de que esta enfermedad en más ocasiones de lo esperado es de difícil diagnóstico con otros procesos tumorales, como es la leucosis linfoide.

En el transcurso de esta década, la epidemiología de la E.M. en España se ha caracterizado por unos altibajos muy llamativos en la incidencia de la enfermedad, con la aparición de brotes graves en efectivos vacunados que han cursado con promedios de mortalidad de 20% en los lotes afectados. Por lo general los brotes se han observado con más frecuencia en gallinas de raza ligera. Debido a que la E.M. no está calificada como de declaración obligatoria. No se dispone de cifras oficialmente respaldadas sobre el número de focos aparecidos. Indudablemente existen datos internos, restrictivos y certeros que poseen las empresas avícolas sobre los casos presentados en sus explotaciones o de sus clientes. Por ello no es irreflexiva la sugerencia de que un organismo o entidad efectuase, retrospectivamente, una recopilación anónima de esa valiosa y detallada información que ayudaría a un conocimiento real de aspectos epidemiológicos y económicos de inestimable utilidad.

## **7. ETIOLOGÍA**

### **7.1. Clasificación**

El virus de la enfermedad de Marek es un herpesvirus relacionado a la célula, con propiedades linfotrópicas similares a las de los herpesvirus gamma. No obstante, su estructura

molecular y organización genómica son similares a los de los herpesvirus alfa. El virus de la enfermedad de Marek es el virus prototipo del grupo de MDV y se le designa como serotipo 1.

También se consideran como parte del grupo MDV, a dos grupos adicionales de herpesvirus no oncógenos aislados a partir de pavos y pollos, respectivamente. Los aislamientos no oncógenos de pollo se denominan como MDV serotipo 2 y a los herpesvirus de pavo, denominados HVT con base en un término logia temprana, se le designa como virus de serotipo 3. La clasificación serotípica para MDV y HVT, se basa en el reconocimiento de epitopes antigénicos comunes y distintos para cada serotipo, Excepto en donde se indique lo contrario, MDV se refiere a los virus de serotipo 1.

Dentro hay diferentes serotipos que se clasifican según la capacidad patógena.

- Serotipo I cepas oncogénicas. Hay cepas medianamente virulentas (sobretudo importante la CVI-988), virulentas (HPRS-16) y muy virulentas (no se usan para hacer vacunas comerciales). Son las que se usan para hacer vacunas.
- Serotipo II cepas patógenas en CN. La más usada es la SOBRE-1.
- Serotipo III cepas patógenas relacionadas antigénicamente con Herpesvirus del pollo (HVT). La más usada para hacer vacunas es la FC-126.

Los herpesvirus aguantan mucho en CN y no se eliminan con los desinfectantes habituales. Es muy difícil de tener controlada.

La enfermedad de Marek se da mundialmente. De todos estos serotipos, pueden aparecer combinaciones de serotipos. Las especies que se afectan son normalmente pollos, pero también en otras aves: faisanes, pavos y codornices. Sobre todo es muy grave en explotaciones intensivas por el tipo de explotación y la dificultad de eliminar el virus.



Se transmite sólo de forma horizontal. Las fuentes de virus son las secreciones y las descamaciones de las células epiteliales de los folículos de las plumas (donde mejor aguanta el virus).

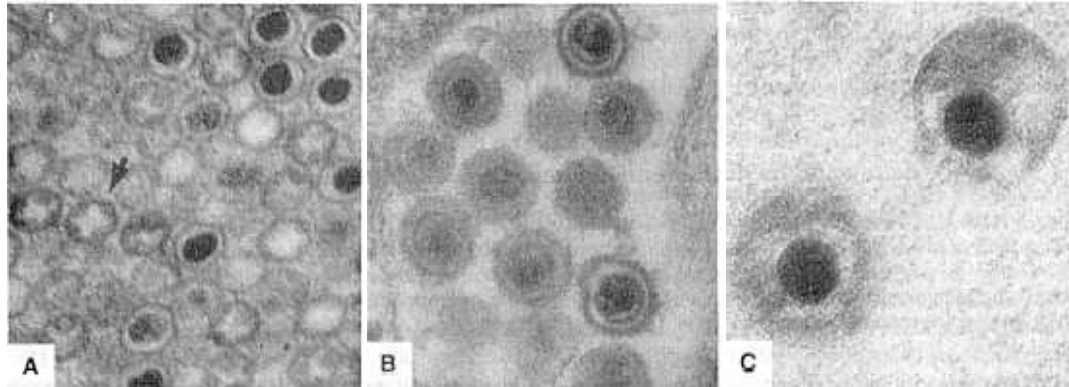
## **8. MORFOLOGÍA Y MORFOGÉNESIS**

Kato y colaboradores (1985.), han revisado la morfología y la morfogénesis de MDV. En general, las partículas virales son las típicas para aquellas descritas para otros herpesvirus

Por lo común, los viriones se observan en el núcleo y con menor frecuencia en el citoplasma o espacios extracelulares. Las partículas desnudas hexagonales o nucleocápsides, de 85 a 100 nm de diámetro, y las partículas cubiertas de 150 a 160 nm de diámetro, pueden observarse en cortes delgados de cultivos celulares infectados. Las partículas virales observadas en preparaciones teñidas negativamente de epitelio de folículo piloso lisado (FPL), tienen envolturas que miden de 273 a 400 nm y que aparecen como estructuras amorfas irregulares (Calnek 1970). Las preparaciones de cortes delgados del FPL, revelan gran cantidad de partículas del herpesvirus con envoltura citoplásmica en células Queratinizantes.

En general, la morfología de HVT se asemeja a la de MDV. Sin embargo, en cortes delgados, las nucleocápsides de HVT muestran por lo común una apariencia cruzada única (Nazerian 1970).

La morfología de MDV serotipo 2 no se ha estudiado en detalle, pero se han visualizado partículas típicas. En la figura 2, se muestra la morfología de los viriones de MDV y HVT. DNA VIRAL.



**Figura 2.** Micrografías electrónicas de MDV y HVT. A. Corte delgado de fibroblasto de embrión de pollo cultivado infectado con HVT. Se ven múltiples nucleocápsides con la estructura interna típica en forma de cruz (flecha). 70 000x. B. Corte delgado de fibroblasto de embrión de pollo cultivado infectado con MDV que muestra viriones envueltos en una vesícula nuclear 60 000x. C. Corte delgado del FPL de pollo infectado con MDV que muestra viriones envueltos dentro de las inclusiones citoplásmicas. Nótese la diferencia en morfología comparada con B. 70 000x (Nazerian).

### 8.1. Propiedades físicas.

El DNA del MDV es una molécula lineal de tira doble que tiene una densidad elástica de 1.706 g/mL, con composición básica de relación de guanina más citosina de 46%, y un peso molecular de 108 a 120 x 10<sup>6</sup> daltones, que es equivalente a un tamaño de 166 a 184 pares de kilo base. La densidad elástica y la relación de guanina más citosina del DNA de HVT es por lo general similar a la del DNA de MDV (Lee 1972); ambos son difíciles de separar del DNA de la célula huésped, pero se han descrito técnicas de preparación. La infectividad del DNA de MDV se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*.

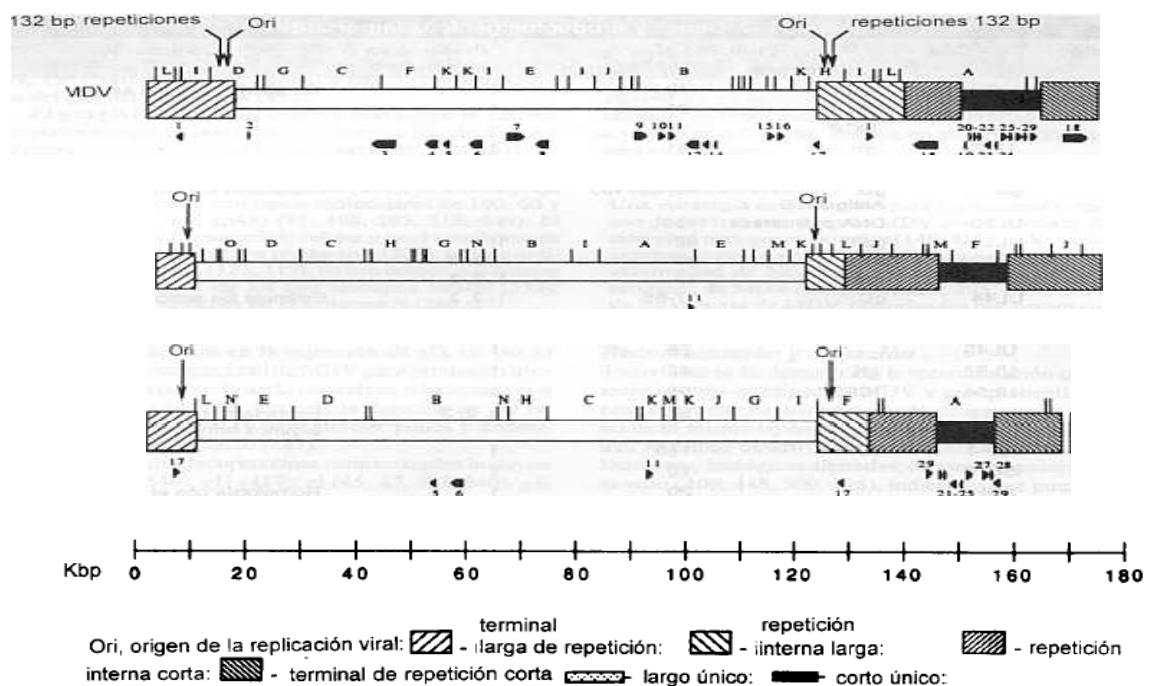
### 8.2. Organización estructural

Los tres serotipos tienen estructuras genómicas constituidas por una región singular larga y una región singular corta, cada una limitada por repeticiones invertidas. Se han construido mapas físicos de restricción de fragmentos de endonucleasa para MDV y HVT, pero aún no para el serotipo

2 de MDV. Con base en la hibridación cruzada de fragmentos de DNA clonados, los genomas de los tres serotipos se encuentran organizados similarmente, o colineales. Sin embargo, se han observado diferencias menores, pero potencialmente importantes en los genomas.

El genoma difiere en tamaño; MDV es el más largo, HVT el más pequeño y el de MDV serotipo 2 resulta intermedio. Los tres serotipos difieren sustancialmente sus patrones de digestión de la endonucleasa de restricción, pero comparten una homología importante a nivel del DNA, en particular con ciertos genes individuales como gB, gC, gD y gH.

En la figura 3 se ilustra el tamaño y la organización estructural de los genomas de los tres serotipos virales



**Figura 3.** Diagrama estructural de los genomas de los tres serotipos del virus de la enfermedad de Marek (MDV). Debajo de cada genoma se indica la ubicación y dirección de transcripción de los principales genes virales con flechas sólidas (véase cuadro 2 para los códigos de genes). Arriba de cada genoma se indican los sitios de restricción BamH1 y con letra los principales fragmentos. (Preparado por R.F. Silva).

### 8.3.- Genes virales y antígenos.

Los esfuerzos por identificar y localizar a los 70 a 80 genes específicos o regiones genómicas relacionados con ciertas funciones biológicas en los tres serotipos, continúan aportando información útil y se está acumulando conocimiento, en particular con MDV. La ubicación aproximada de los genes identificados para cada serotipo, se señalan en la figura 3. A pesar de que se han identificado tantos como 46 polipéptidos específicos de virus mediante la inmunoprecipitación de extractos de células infectadas con MDV o HVT (Ikuta 1981), sólo se conoce bien a algunos de ellos (antígeno A, antígeno B y pp38), por tener importantes propiedades antigénicas o funcionales.

Para gran parte de los métodos de detección, son críticos los anticuerpos monoclonales específicos como el M26 para el antígeno A, IAN86 para el antígeno B, Y el H 19 para pp38. Los genes reconocidos de MDV pueden agruparse en las siguientes categorías: oncogenicidad relacionada, glucoproteína y otros. En el cuadro 1 se enlistan los principales genes, productos génicos y sus funciones probables, y algunos de éstos también se abordan más adelante Genes relacionados con la oncogenicidad.

**Cuadro 1. Genes y productos génicos importantes.**

Código	Gen	Producto génico.		Presente en el serotipo	Comentarios.
		Nombre	PM (dK)		
1	mEq	mEq	40	1	Se asemeja al gen jun/fos
2	UL1	gL	25		
3	UL19	MCP	150		

4	UL22	gH	91	1	
5	TK	TK	39	1,3	
6	g8	g8 Antígeno B	49,60.100	1	Protección inmunitaria
7	UL30	DNA polimerasa	130	1	
8	UL32	gp82	82	1	
9	UL39	RR1	92	1,2,3	
10	UL40	RR2	38	1,2,3	
11	UL44	gC, Antígeno C	57-65	1,2,3	Estimula los anticuerpos AGP
12	UL47		92		
13	UL48	VP16	49		
14	49		28		
15	UL53	gK	40		
16	UL54	ICP27	55		
17	pp38	pp38	38	1,2,3	Expresado en líneas celulares y algunos tumores
18	ICP4	ICP4	155		
19	SORF1		10		
20	SORF2		20		Homología con el virus de la viruela aviar
21	US1	ICP22	20	1,3	
22	US10	VP22	24	1,3	
23	SORF3		41	1,3	
24	US2		30	1,3	
25	US3	Proteína cinasa	45	1, 3	
26	SORF4		17	1	

27	US6	gD	43	1, 3
28	US7	gI	38	1, 3
29	US8	gE	54	1, 3

\*g(gp), glucoproteína; PIC, proteína intracelular; kD, Kilodalton; PPC, proteína principal de cápside; mEq, EcoQ de Marek; fp, fosfoproteína; RR, ribonucleótido reductasa; SORF, cuadro abierto de lectura; TK, timidina cinasa; UL, longitud única; US duración única; VP, proteína de virión. Los nombres de los genes y de los productos génicos se basan en homólogos a HSV Cuadro preparado por LF Lee.

Tres genes o secuencias de DNA, que podrían relacionarse con la oncogenicidad del MDV serotipo 1, incluye genes que flanquean las 132 repeticiones de pares de bases, de pp38 y mEq. En el MDV atenuado, se ha identificado y mapeado una región de expansión heterogénea que contiene múltiples repeticiones de bases de pares (rbp) en la región de repetición inversa que flanquea la única porción larga del genoma. Esta región se ha identificado como una familia de genes que contiene tres exones. Por lo general, las cepas virulentas tienen pocas copias de 132 rbp y las cepas atenuadas poseen múltiples copias, una distinción que constituye la base de la diferenciación mediante PCR. La función de esta región requiere de mayor estudio, pero el hallazgo de que los oligonucleótidos complementarios (antisentido) a las copias de 132 rbp, inhiben la proliferación de líneas celulares de linfoblastoides (Kawamura 1991), puede aportar una luz inicial.

El gen pp38 se ha clonado y secuenciado. Esto resulta de interés, debido a que su producto, una fosfoproteína de 38kD, se expresa de manera variable en tumores y líneas celulares y debido a que no existe algún homólogo en los herpesvirus de mamíferos. En el MDV serotipo y en HVT también hay homólogos de pp38, pero ningún gen parece relacionarse de manera cercana al pp38 de MDV.

El antígeno a pp38, es un complejo de proteína fosforilada específico de virus que contiene polipéptidos 39, 36 Y 24 kD, los cuales se demostraron en el citoplasma de linfocitos infectados de manera latente y transformados por MDV, así como células infectadas de manera productiva Incluyendo al. Este antígeno puede demostrarse en células infectadas de manera y en células tumorales de EM, así como en células infectadas de manera latente productiva con MDV serotipo 1 excepto, curiosamente, la cepa CVI988 y sus derivados. La expresión de pp38 es variable (o inconsistente), pero puede potenciarse mediante tratamiento con IUdR o transfección con el gen ICP4. El antígeno pp38 puede tener algún valor diagnóstico cuando se encuentra en células tumorales.

MEq (EcoQ de Marek) se expresa en células transformadas (Jones 1992). Este gen tiene homología con el tipo de cierre de leucina de oncogenes y también codifica para un dominio rico en prolina, característico de otra clase de factores de transcripción. Una región promotora de este gen, contiene secuencias que asemejan el elemento de choque de calor. El producto proteínico de mEq no se ha caracterizado. Todos los mapas de genes potenciales relacionados con oncogenicidad, se encuentran cercanos en las regiones repetidas del genoma de MDV. En los linfomas por EM, la expresión de los genes, determinada por transcripción, se encuentra muy limitada a una zona similar del genoma localizado en o cerca de las regiones de repetición. Y en otra región cercana al gen ICP4. Con el fin de establecer una relación causal entre cualquiera de estos genes y la oncogenicidad, se requerirán de más investigaciones.

#### **8.4. Genes de glucoproteínas.**

El gen gC codifica a la glucoproteína conocida como antígeno A. Y resulta de interés debido a su amplia expresión en células infectadas de manera productiva. El antígeno A identificado originalmente en líquidos flotantes de cultivos celulares infectados mediante pruebas de precipitación en agar gel (PAG) (Churchill 1969), se ha caracterizado como una glucoproteína (gp57/65) de 57 a 65 kD. Se demuestra en la superficie celular y en el citoplasma de células infectadas de manera productiva; es secretada activamente por células infectadas, no parece estar relacionada a la oncogenicidad y tal vez sea el antígeno que origina los anticuerpos detectados en antisueros de convalecientes mediante PAG. La producción de antígeno A, disminuye con el pasaje seriado de MDV en cultivos celulares, probablemente debido a una menor transcripción del gen del antígeno A. El gen gB, el cual codifica al antígeno B, resulta importante porque su producto proteínico se ha relacionado con respuestas inmunitarias protectoras. El antígeno B, identificado de manera original mediante PAG como un antígeno no secretado, es un complejo de tres glucoproteínas con pesos moleculares de 100, 60 Y 49 kD (gp 100, gp60, gp49). El antígeno se ubica en la superficie celular y en el citoplasma de células infectadas de manera productiva. Induce anticuerpos neutralizantes. Se han notado diferencias entre los antígenos B de los tres serotipos virales; existen múltiples epítomos en el antígeno B.

El gen gD no se expresa in vitro, aunque la presencia de anticuerpos antígeno D en sueros de convalecientes, argumenta por lo menos una expresión limitada in vivo (Ross1991). Las deficiencias en la expresión de gD, tal vez se relacionen con la incapacidad de MDV para producir virion infectantes, explicando así la naturaleza relacionada con células del virus. No obstante, la delección de gD no anula la capacidad de MDV para infectar pollos y diseminarse por medio de contacto. Otros genes de glucoproteínas caracterizados incluyen gE , gH , gI, gK y gL .



### **8.5 Otros genes.**

Se ha identificado a una cantidad de otros genes y se han establecido o inferido algunas funciones, por medio de comparaciones con homólogos en otros herpesvirus. Varios genes codificadores de enzimas que podrían estar implicados en la replicación se han reconocido, por ejemplo, timidina cinasa, ribonucleótido reductasa y la DNA reductasa (Lee 1996). Los genes predichos para codificar proteínas tegumentarias incluyen a UL49, UL48, UL47 y UL46. El UL48 puede codificar para el homólogo de VPI6, que se encuentra implicado en otros herpesvirus con la trans-activación de genes inmediatos tempranos. Otros genes de este último tipo, codifican proteínas que regulan de manera probable los eventos relacionados con la replicación viral e incluyen a ICP4 e ICP27. Las transcripciones antisentido del gen ICP4 podrían relacionarse con la latencia. En los tres serotipos se han identificado los orígenes de la replicación. Aunque varias secuencias génicas de MDV representan homólogos del herpesvirus simple, también se han identificado secuencias únicas, por ejemplo, SORF1, SORF2 y SORF3.

Por medio de pruebas AF, con sueros de convalecientes, se han demostrado los antígenos de membrana viral y los antígenos internos virales de las características moleculares no especificadas. Probablemente, ambos tipos de antígenos sean mezclas de antígenos producidos coordinadamente en células infectadas de manera productiva.

Aunque no bien definidos, estos antígenos contribuyeron a varios estudios iniciales y todavía tienen utilidad como indicadores de infección viral. El antígeno pp40, detectable mediante el anticuerpo monoclonal 2BN90 en el núcleo de las células infectadas, se encontró en todos los MD V serotipo I probados, incluyendo a varias cepas CVI988; todavía no se ha identificado el gen para este antígeno.

## **8.6. Vectores virales.**

Una estrategia en desarrollo para las vacunas aviares, es el uso de los tres serotipos de MDV como vectores de expresión viral para genes extraños (Finkelstein 1989). Tales vectores han expresado genes de otros microorganismos como el de la enfermedad de Newcastle o Escherichia coli, o de otros serotipos de MDV. Una ventaja de las vacunas de MDV vectorizadas por herpesvirus es su capacidad para inducir inmunidad contra EM así como el producto del gen extraño.

## **8.7 Recombinación y mutación.**

Todavía no se ha demostrado la recombinación espontánea entre los tres serotipos de MDV y con probabilidad no es común, a pesar de la frecuencia de infecciones concomitantes en el mismo tejido o célula. No obstante, los tres serotipos desarrollan rápidamente características moleculares y biológicas alteradas, después de pasajes seriados in vitro, indicando que pueden existir mutaciones espontáneas. Se han descrito un mutante de MDV sensible a la temperatura y un mutante de HVT que era resistente a la inhibición por fosfonoacetato.

La evolución gradual de los patotipos hacia una mayor virulencia y los cambios en las propiedades biológicas de MDV durante un retropasaje in vivo, apoyan además la mutabilidad de los MDV. El cocultivo in vitro de MDV con retrovirus aviares resultó en la inserción espontánea de LTR de los pro virus retrovirales en el genoma de MDV, a menudo en sitios preferenciales.

### **8.8. Replicación viral.**

La replicación de MDV, MDV serotipo 2 y HVT es la típica de otros herpesvirus relacionados con células y ha sido revisada por Kato y Hirai (1985) y Ross *et al.* Para la infección inicial de los cultivos o pollos mediante virus libres de células, los viriones cubiertos penetran a las células susceptibles por medio de absorción y penetración convencionales, lo cual sucede en el término de una hora en cultivos celulares. El proceso se acelera mediante queladores tal como el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) en el caso de MDV. La infección inicial por virus relacionados con células y la diseminación de la infección iniciada ya sea por virus libres de células o relacionados con células, se desarrolla por contacto directo con las células infectadas.

La transferencia célula a célula de la infección *in vitro* se potencia por la fusión celular y por lo común está acompañada por la formación de puentes intracelulares, y se presume que es el principal modo de diseminación viral tanto *in vitro* como *in vivo*. La replicación viral del DNA sucede durante la fase S de la replicación celular (Lau 1980). Los índices de replicación varían con el serotipo y el grado de pasaje de la cepa viral.

### **8.9 Tipos generales de interacción.**

Se reconocen tres tipos generales de interacciones celulares: productiva, latente y transformadora.

### **8.9.1. Infección productiva**

En la infección productiva, hay replicación del DNA viral, se sintetizan antígenos y en algunos casos se generan partículas virales. El número de copias de genoma por célula puede exceder las 200. Hay dos tipos de infección productiva. La infección productiva completa con MDV en el FPL de pollos provoca el desarrollo de un número abundante de viriones recubiertos, por completo infecciosos. En una infección productiva-restrictiva, se originan antígenos, pero la mayor parte de los viriones producidos no están recubiertos y, por tanto, no son infecciosos. No obstante, puede haber un número variable de viriones cubiertos en las células cultivadas, y éstos pueden obtenerse libres de células e infecciones por medio de la rotura de las células en agua destilada, o un estabilizador apropiado. Se ha descrito una cepa variante de HVT que libera cantidades abundantes de virus libres de célula en el medio de cultivos de células infectadas (Yachida 1986).

En todos los tipos de células, la infección productiva es lítica y conduce a una formación de cuerpos de inclusión intranucleares, destrucción celular y, en el pollo, la formación franca de lesión necrobiótica. Debido a esto, a la infección productiva se le ha denominado citolítica y los términos se usan como sinónimos. Se observa policariocitosis en fibroblastos cultivados, y es un componente principal de las placas o focos virales que se usan a menudo y como un marcador en las valoraciones de virus.

Los antígenos presentes en las células infectadas de manera productiva, por lo menos en las infecciones completamente productivas en las cuales se originan viriones cubiertos, Probablemente representen los productos de una cantidad de genes virales expresados.

En los fibroblastos infectados de manera productiva, la mayor parte del genoma del MDV se transcribe. Puede detectarse RNA viral transcrito tanto en el núcleo como en el citoplasma. Se han descrito diferencias en transcripción entre la infección productiva con cepas virulentas y atenuadas del serotipo 1. En la infección productiva en cultivos de células influyen varios factores. Se necesita arginina. El proceso de replicación requiere de la síntesis de DNA polimerasa, la cual puede ser inhibida por fosfonoacetato y fosfonoformato. El efecto de otros inhibidores de la replicación del MDV lo ha repasado Ross *et al.* El tamaño de placa aumentó o disminuyó con distintas dosis de dimetilsulfóxido en el medio de cultivo. Aunque puede producirse interferón o cuando menos algunas cepas de MDV y HVT su efecto en la duplicación del virus parece leve. En la velocidad de crecimiento in vitro del MDV y del HVT también influyen la temperatura del cultivo y el tipo celular.

### **8.9.2. Infección latente**

Las infecciones latentes no son productivas y pueden detectarse únicamente mediante hibridación con sondas de DNA o métodos diseñados para activar el genoma viral, como en el cultivo in vitro; sólo se encuentran cerca de cinco copias del genoma viral. Aunque algunos genes pueden transcribirse, no sucede la traslación y por lo común no se encuentran antígenos relacionados con el virus o con el tumor. Sin embargo, el cultivo in vitro resulta en la producción de antígenos y partículas virales, representando una liberación de la latencia. Por lo menos dos citocinas producidas por cultivos de células de bazo estimuladas mediante concavalina A, pueden ayudar a conservar la latencia en los linfocitos cultivados; una de éstas se ha identificado definitivamente como interferón, el cual ha demostrado suprimir la producción de antígenos virales inmediatos-tempranos, tempranos y tardíos en linfocitos infectados de manera latente.

Curiosamente, el interferón resultó más eficaz en la supresión de los genes virales en las etapas tardías de latencia que durante las iniciales. Se ha demostrado infección latente, luego de la infección de pollos con virus del serotipo 2 y 3.

Holland (1994) y colaboradores, han informado de bajos valores de expresión de gB en tejidos linfoides infectados de manera latente con HVT, pero esto puede indicar más bien la reactivación viral en células seleccionadas en vez de la latencia. De hecho, puede inducirse la reactivación selectiva de las células infectadas de manera latente, mediante el tratamiento con ciclosporina o betametazona, pero no por medio de la infección con virus inmunosupresores como el de la enfermedad infecciosa de la bolsa o el de la Reticuloendoteliosis.

### **8.9.3. Infección transformadora.**

Por definición, la infección transformadora se desarrolla en células transformadas por el serotipo 1 del MDV. A diferencia de la infección latente, en la cual existe el genoma viral, pero que sólo se expresa en cierto grado, el fenotipo transformado se caracteriza por una expresión más amplia del genoma del MDV, resultando en ocasiones en la producción de antígenos.

Las células transformadas contienen cerca de 5 a 15 copias del genoma viral, aunque la cantidad promedio varía en líneas celulares diferentes bajo condiciones distintas, tal vez en relación a la proporción de células infectadas de manera productiva en la población. El DNA viral de las células transformadas se encuentra altamente metilado, mientras que al mismo tiempo no se detectó metilación en el DNA viral de las células infectadas de manera productiva.

Puede transcribirse una porción del genoma viral y se ha identificado y mapeado una cantidad de transcripciones en las células transformadas. De estas transcripciones, algunas, pero no

todas, difieren de aquellas provenientes de células infectadas de manera productiva. De los diversos antígenos virales, sólo se ha detectado a pp38 en las células transformadas, pero resulta variable la frecuencia de las células que expresan pp38. En líneas de células linfoblastoides, también se ha identificado al antígeno pp40. No se detectaron antígenos en las células de linfomas o líneas de células linfoblastoides mediante pruebas AF con sueros de convalecientes, excepto por células ocasionales que con probabilidad se hayan convertido a una infección productiva y por definición ya no se transforman más.

Algunos linfocitos transformados pueden ser inducidos para generar antígenos virales mediante tratamientos con yododesoxiuridina o por cultivo a temperaturas subóptimas.

Se detectó un antígeno de superficie relacionado con el tumor de EM (MATSA, del inglés MD tumor associated surface antigen), en células de linfomas de EM y líneas celulares linfoblastoides derivadas de linfomas (Powell 1974).

Este antígeno no se detectó en las superficies de las células infectadas de manera productiva. Aunque al inicio no pareció que se relacionaran con la mayor parte de los linfocitos infectados de manera latente, los MATSA también se detectaron en linfocitos de pollos vacunados con HVT o cepas no oncógenas de MDV; estudios posteriores con anticuerpos monoclonales mostraron que los MATSA estaban presentes en las células T activadas de pollos no infectados. Por tanto, la MATSA se le considera hoy en día como un antígeno huésped y está claro que no es específico de tumores. No obstante, aún es de importancia en el diagnóstico diferencial de la EM.

#### **8.9.4. Integración del DNA viral.**

Ha resultado difícil determinar el grado en el que se integra el DNA viral dentro del genoma de la célula huésped durante las infecciones productiva, latente o de transformación. Los informes iniciales indican una ausencia de integración o una mezcla de DNA integrado y episomal. El DNA viral se relacionó con cromosomas de dos clases de tamaños separados por centrifugación de gradiente de densidad (Hughes 1980), Y con los cromosomas números 2 y 4 mediante hibridación *in situ*, dando apoyo adicional a la idea de que se produce cierta integración. De manera más reciente se ha demostrado mediante hibridación fluorescente *in situ*, que el DNA viral se integra a los cromosomas en 2 a 12 sitios, aunque fueron diferentes los patrones de integración entre las líneas celulares. En las células de linfoma primario, la integración se desarrolló al azar en múltiples sitios, pero no se detectaron genomas de MDV circulares y virión de DNA lineal. Estos datos también sugieren que los linfomas por EM tienen un origen clónico, una observación novedosa con implicaciones importantes para los mecanismos de oncogénesis

#### **8.10 Diferencias entre los serotipos.**

En la mayor parte de los informes, la replicación del MDV y del HVT es similar. Los tres serotipos inducen infección productiva en cultivos de fibroblasto permisivo. La infección latente también se origina con todos los virus. A pesar de ello, la infección transformadora sólo se ha demostrado con el MDV virulento. Como el HVT y el MDV serotipo 2 no son oncógenos (Schat 1978), no se han derivado líneas celulares equivalentes a las derivadas de los linfomas de EM. No obstante, se ha derivado una línea de células esplénicas de un pollo vacunado con HVT, que tiene genomas tanto de MDV como de HVT. No se tiene la certeza de cuál virus es el causante de la transformación, pero es interesante la capacidad de coexistir de ambos genomas en una célula



simple. Calnek y colaboradores (1978) también aislaron HVT y MDV infecciosos de una línea celular sencilla.

Los cultivos de células infectadas de manera productiva han sido una fuente común de desarrollo de virus relacionados con células para los tres serotipos virales y para las existencias de HVT libre de células. El virus libre de células de los serotipos 1 y 2 se obtiene mejor de los cultivos de células de FPL (virus de bajo pasaje) o de células infectadas (virus de alto pasaje), aunque pueden obtenerse cantidades reducidas por virus de bajo pasaje células infectadas lisadas. Se han descrito técnicas para la producción y criopreservación de lotes de virus tanto libres como relacionados con células.

## **9. ESTABILIDAD Y DESINFECCIÓN.**

Hay MDV y HVT en estados ya sea relacionados con células o libres de células, que tienen propiedades de modo considerable distintas de supervivencia. Los lotes de MDV o HVT relacionados con células, pueden criopreservarse mediante métodos estándares y almacenarse a -196 °C (Spencer 1967). Sin embargo, la infectividad de tales lotes se relaciona directamente con la viabilidad de las células contenidas en dichas preparaciones. En condiciones ideales, la vida media de las vacunas relacionadas con células puede ser de 2 a 6 horas (Thornton 1985).

Los preparados de MDV libres de células conseguidos de la piel de pollos infectados, se inactivaron cuando se trataron durante 10 minutos a pH 3 u 11 y se almacenaron durante dos semanas a 4 °C, cuatro días a 25 °C, 18 horas a 37 °C, 30 minutos a 56 °C o 10 minutos a 60 °C. MDV libre de células proveniente de la piel o ya sea MDV o HVT de los cultivos celulares infectados puede almacenarse a -70 °C o liofilizarse. La caspa, la cama y las plumas de las aves infectadas resultan infectantes y contienen presumiblemente virus libres de células provenientes de la unión de

FPL a los restos celulares. La infectividad de tales materiales se retuvo por 4 a 8 meses a temperatura ambiente (Hlozanek 1973) Y por lo menos durante 10 años a 4 °C, pero la infectividad se inactivó por una variedad de desinfectantes químicos comunes mediante un tratamiento de 10 minutos. La supervivencia de los virus en la cama puede afectarse de manera adversa por una mayor humedad.

La potencia de las vacunas relacionadas con células como de aquellas libres de células puede alterarse de manera adversa por la temperatura de almacenaje, técnica de reconstitución, elección del diluyente, tiempo de conservación y temperatura posterior a la reconstitución.

## **10. CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS.**

### **10.1. Serotipos**

Bülow (1975) y Biggs *et al*, clasificaron al grupo de herpesvirus MDV en tres grupos distintos correlacionados con las propiedades biológica. Normalmente se utilizan dos anticuerpos monoclonales específicos de tipo para determinar el serotipo viral. Aunque pueden distinguirse mediante pruebas serológicas, los tres serotipos también comparten múltiples antígenos comunes. Por tanto, el suero contra un serotipo reaccionará de ordinario con los antígenos de los demás serotipos, aunque un poco menos intensamente que con los antígenos homólogos.

Con el serotipo viral se encuentra relacionada una cantidad de características biológica. Los virus del serotipo 1 de bajo pasaje que crecen mejor en fibroblastos de embrión de pato o en cultivos celulares de riñón de pollo, lo hacen de manera lenta, y producen pequeñas placas. Los virus del serotipo 2 que crecen mejor en fibroblastos de embriones de pollo, crecen de manera lenta y originan placas medianas con algunos sincitios grandes. Los virus del serotipo 3 (HVT) que se

desarrollan mejor en fibroblastos de embriones de pollo, lo hacen rápidamente y originan grandes placas. Pueden extraerse virus más infecciosos a partir de las células infectadas con HVT, que de aquellas células infectadas con virus de los serotipos 1 a 2.

## **10.2. Patotipos**

La virulencia u oncogenicidad se relaciona solamente con los MDV del serotipo I. Dentro de este grupo, se reconoce una gran variación en el potencial patógeno y sin alguna duda representa un continuo desde aquellos casi avirulentos hasta los que tienen máxima virulencia. Se propuso una clasificación patotípica (Witter 1983), en la cual se designaban tres tipos de virus y acrónimos relacionados como leve (mMDV), virulento (vMDV) o muy virulento (vvMDV). La patotipificación de los aislamientos virales implica pruebas de patogenicidad en pollos vacunados y sin vacunar; no se han desarrollado otros métodos que no sean *in vitro*.

Los prototipos son las cepas CU2 de mMDV, la JM, GA Y HPRS-16 de vMDV, y las cepas Md5 y RBIB de vvMDV. Se ha sospechado o pensado de patotipos que exceden la virulencia de vvMDV y se ha informado por lo menos de una de tales cepas, la 584A.

Se reconoce un patrón de evolución en la virulencia de las cepas de MDV. Por varios años, EM fue una enfermedad clásica inducida por los virus del patotipo mMDV. A finales del decenio de 1940, se observó primero una forma más virulenta de EM, relacionada con los virus del patotipo vMDV, que se convirtió en el patotipo dominante durante el decenio de 1960. Las cepas virales del patotipo vvMDV, se observaron primero a finales del decenio de 1970, principalmente en parvadas vacunadas contra HVT con pérdidas excesivas por EM, y actualmente parece ser el tipo dominante.

Ciertas características biológicas también se encuentran relacionadas con los patotipos del serotipo 1 del MDV, pero son más pronunciadas entre las cepas de bajo y alto pasaje (atenuadas). El pasaje seriado in vitro (por lo general, se requieren de 30 a 70 pasajes) resulta en la atenuación de los aislamientos virulentos. Las cepas atenuadas crecen con mayor facilidad in vitro, pero originan títulos menores de viremia in vivo, lo cual puede estar relacionado con una disminución notable en la capacidad para infectar, replicar o ambos, en linfocitos. La producción de antígeno A se encuentra reducida o ausente. Las cepas atenuadas no se diseminan bien entre pollos mediante contacto.

Ciertas cepas se atenúan de manera incompleta e inducen lesiones menores en pollos susceptibles. Las cepas sobres atenuados no se replican en pollos protegidos. El potencial de crecimiento in vivo de los aislamientos atenuados del serotipo 1, se ha mejorado por medio de retropasaje en pollos, aunque en un caso también se incrementó la virulencia.

La incidencia de tumores inducidos por cepas de baja virulencia del serotipo 1 de MDV se incrementa por infección *in ovo* o por inmunosupresión. Los virus de los serotipos 2 y 3 permanecieron siendo o oncogénicos después de tratamientos similares.

## **11. SISTEMAS DE HUÉSPED DE LABORATORIO**

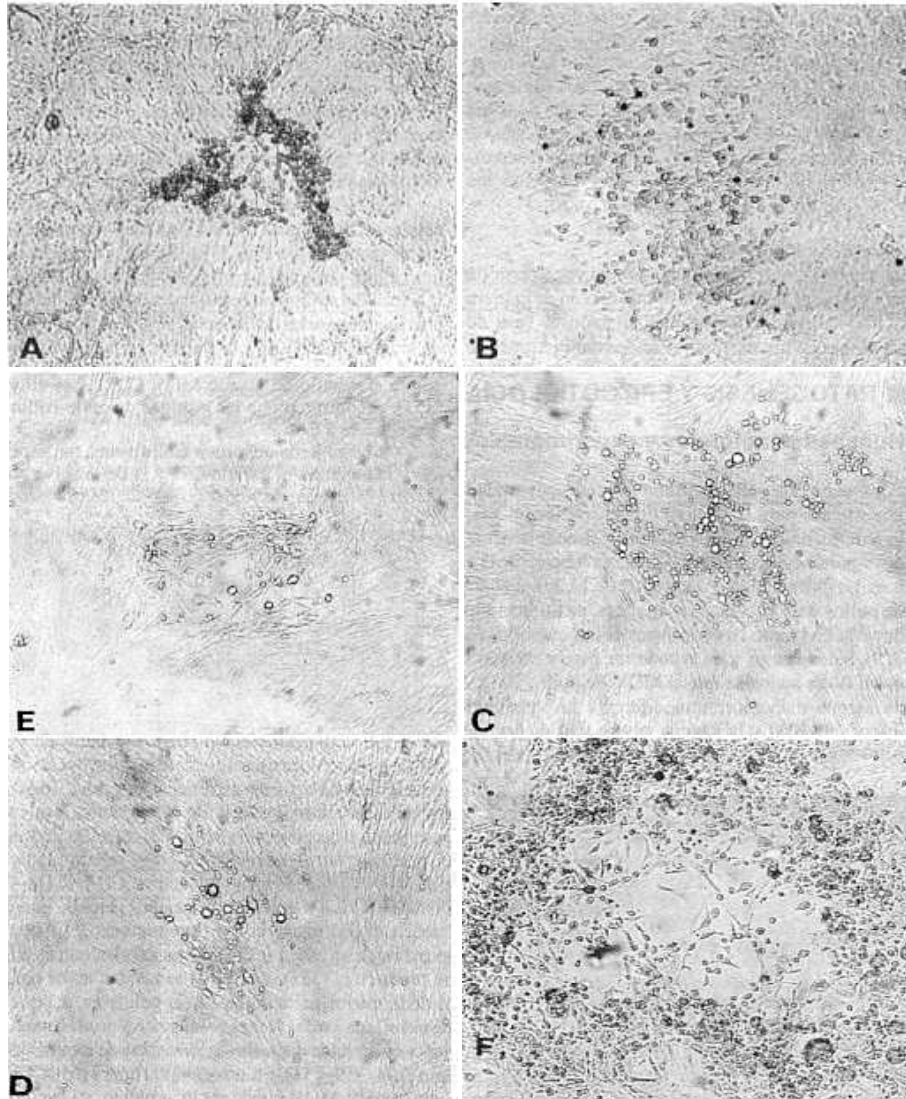
El MDV se ha propagado y valorado en pollos recién nacidos, cultivos de tejido y huevos embrionados. Las líneas celulares linfoblastoides de linfomas de EM también son sistemas de laboratorio del huésped importantes.

### **11.1. Pollos**

Los pollos recién nacidos inoculados con serotipo 1 virulento de MDV, desarrollan lesiones que pueden detectarse histológicamente en ganglios, nervios y ciertas vísceras después de 2 a 4 semanas. La respuesta depende en grado considerable de la susceptibilidad genética del pollo y la virulencia del MDV aislado. La presencia del virus o anticuerpos, que puede detectarse en las pruebas in vitro, o la presencia de antígeno relacionado al virus detectado por pruebas AF en tejido, también son respuestas de huésped específicas de pollos inoculados con infección por EM. Todas estas respuestas se aumentan en grado muy manifiesto en aquellos polluelos que carecen de anticuerpos maternos contra MDV. La inducción de lesiones específicas del virus en la membrana del ala, o en la pulpa de pluma, constituyen sistemas alternos de huésped que proporcionan acceso directo al sitio de desarrollo de la lesión.

### **11.2. Cultivos celulares**

Los fibroblastos del embrión de pato o las células de riñón de embrión de pollo cultivados resultan adecuados para la propagación de aislamientos de MDV de bajo pasaje. El MDV atenuado y los virus de los serotipos 2 y 3 proliferan bien en cultivos con fibroblastos de embrión de pollo. Los cultivos infectados suelen desarrollar lesiones focales separadas, constituidas por agrupamientos de células redondas refráctiles en degeneración cuando maduran. Estas lesiones se llaman focos o placas (Figura 4).



**Figura 4.** Lesiones focales en células cultivadas infectadas con varios serotipos de MDV. a Pasaje bajo de serotipo 1 de MDV en células de riñón de pollos cultivadas de un pollo infectado, nueve días. B. Pasaje bajo de serotipo 1 de MDV en fibroblastos de embrión de pollo (FEP), cinco días. C. Pasaje alto de serotipo 1 atenuado de MDV en fibroblastos de embrión de pollo (FEP), cinco días. D. Pasaje bajo de serotipo 2 de MDV en FEP, ocho días. E. Pasaje bajo de serotipo 3 de HVf en FEP, cuatro días. F. Pasaje bajo de HVf en FEP, 12 días. Todas las fotos sin teñir, cerca de 40x.

Las lesiones suelen ser menores a 1 mm de diámetro y de densidad celular variable. Las células afectadas pueden contener dos a varios cientos de núcleos, y se observan de ordinario cuerpos de inclusión intranucleares tipo A. A pesar de la liberación de células redondas en el medio al madurar las placas, no se observan áreas grandes de lisis celular.

Se desarrollan placas de serotipo 1 luego de 5 a 14 días de aislamiento primario y de 3 a 7 días después de la adaptación al cultivo y de ordinario se enumeran por medio de examen microscópico. Se han descrito diferencias en el desarrollo y morfología de las placas de serotipo 1 en células de pollo y pato (Witter., *et al* 1969) Y en placas inducidas por los tres serotipos virales. Asimismo, se han usado otros sistemas de cultivo celular, como piel de embrión de pollo, o explantes traqueales.

El serotipo 1 de MDV, pero no el serotipo 2, puede crecer en linfocitos esplénicos de pollo *in vitro*. Se efectúan pasajes mediante la adición de células esplénicas frescas a la suspensión de cultivo celular cada dos días, y se vigila la infección por medio de inmunofluorescencia. El HVT puede crecer de manera similar en cultivos de células esplénicas de pavo, pero el antígeno viral se observa pocas veces, si es que alguna.

### **11.3. Embriones**

Se desarrollan pústulas con virus (Figura 5) en la membrana corioalantoides (MCA) de embriones de pollo después de la inoculación del saco vitelino con preparados de MDV celular. También se han utilizado embriones para la evaluación de la vacuna de EM, ya que cada vez es más frecuente la vacunación *in ovo* en el campo. En este caso, los embriones se inoculan normalmente con virus vacúnales en el saco amniótico en el día 18 (Sharma 1982). El potencial de crecimiento del MDV del serotipo 1 es menor que para los serotipos 2 y 3 en los embriones de 18 días.



**Figura 5.** MCA de embrión de pollo de 19 días de edad inoculado por el saco vitelino a los cuatro días con sangre de pollos infectados con aislamiento JM.

#### **11.4. Líneas celulares linfoblastoides.**

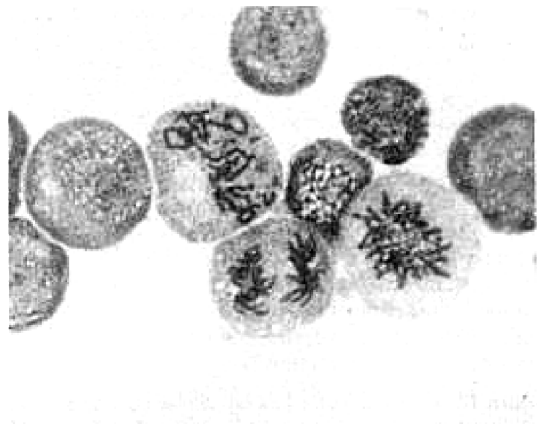
Estas líneas fueron desarrolladas por primera vez a partir de linfomas de EM que crecen de manera continua en el cultivo de células sin fijación al vaso de cultivo. Las líneas celulares linfoblastoides también pueden establecerse a partir de linfocitos obtenidos de lesiones tempranas (4 a 6 días pos infección (PI), inducidas en el pliegue del ala o músculo pectoral por medio de la inyección de una mezcla de MDV y células renales alógenas. Todas las líneas, ya sean de linfomas de pollo o de lesiones locales tempranas, tienen marcadores de células T; aquellas de los linfomas por lo general son CD4+/CD8-, mientras que aquellos de las lesiones tempranas pueden ser CD4+/CD8-, CD4-1CD8+ o CD4-1CD8- (Schat *et al* 1989). La mayor parte de estas líneas pueden denominarse como "productoras", ya que una proporción reducida (1 a 2%) de las células entran en infección productiva. Los virus se pueden aislar con facilidad de la mayor parte de las líneas celulares, aunque se han desarrollado varias líneas celulares no productoras, en las cuales es limitada o ausente la evidencia de expresión de genoma. En una de estas líneas (MDCCRPI), el



genoma de MDV puede ser incompleto, ya que no se ha aislado algún virus en estudios in vitro o in vivo.

El cultivo prolongado puede resultar en una expresión reducida del genoma de MDV. En gran parte de, pero no en todas, las líneas celulares de EM establecidas a partir de linfomas, se encontró que mostraban una aberración cromosómica en la cual una amplificación del DNA resultó en una banda G de más y en una interbanda en el brazo corto de un homólogo del cromosoma 1. Se encontró, que la aberración sólo se establecía de manera poco frecuente en las líneas EM establecidas en lesiones de EM, y queda por determinar si existe alguna relación entre esta modificación y la transformación neoclásica.

Los índices de éxito para el establecimiento de líneas celulares de linfomas de EM, han mejorado a causa de una mejor metodología. Se ha informado de una línea celular generada a partir de infección in vitro. En la actualidad se dispone de múltiples líneas celulares que comprenden varias de linfomas de EM en pavos. Las células de la línea MDCC-RP1 se ilustran en la figura 6.



**Figura 6.** Frotis de la línea celular MDCC-RP1. Nótese la morfología linfoblastoide característica y las figuras mitóticas. Giemsa, 1500x (Nazerian)

## 12. EPIZOOTIOLOGÍA.

### 12.1. Distribución de la enfermedad.

La EM en su forma aguda se conoce a la fecha en todo el mundo, especialmente en aquellos países en donde la avicultura se explota en forma intensiva. Antes de haberse descubierto la vacuna, la tasa de mortalidad en las parvadas iban del 10 al 30% y en ocasiones llegaban a alcanzar hasta un 60%. La forma aguda de la enfermedad se presentó por primera vez en los EUA en 1956 (Benton 1917). Subsecuentemente se propagó a otros países y además de atacar a gallinas ponedoras también empezó a producir problemas en el pollo de engorda, en México, Cruz (1974) informaron que durante el periodo comprendido entre los años de 1970 y 1974 los decomisos en los EUA en donde los decomisos por EM aumentaron quince veces de 1960 a 1970.

Existen muchas interrogantes con respecto a la variación de la patogenicidad sufrida por el VEM puesto que de ser una enfermedad de poca importancia, que produce generalmente ligeras lesiones en las aves afectadas, pasó a ser en pocos años uno de los primeros obstáculos de la avicultura. Existen algunas teorías que tratan de explicar esta situación. Una de ellas dice que el virus ha sufrido mutaciones, otra señala que las explotaciones intensivas han traído como consecuencia un cambio radical en el manejo, y la tercera posibilidad indica que las nuevas líneas desarrolladas pueden ser más susceptibles a la EM.

La infección con el VEM casi siempre está presente en las parvadas, mientras que dentro de una granja la mayoría de los pollos están infectados o han tenido contacto con el virus (Iaconesco 1971). También se ha encontrado el virus en pollos de monte en Malaya y en pollos criollos de Kenia y Nigeria.

La presencia de la enfermedad en una granja depende del virus que infecta los pollitos. Normalmente la infección se establece en las primeras semanas de vida de las aves. Una vez iniciada la infección persiste durante todo el tiempo que se mantiene la parvada y en muchos de los pollos persistirá toda su vida.

## **12.2. Transmisión.**

Por años no se supo la forma de transmisión. Cole y Hutt (1969) informaron que no había evidencia de la transmisión vertical, mientras otros notaron que si fue transmitido por el huevo. Estos informes se difundieron en sus interpretaciones, ya que en esta época no se diferencio la EM de la leucosis aviar. Sharma *et al* (1971) aisló el VEM, a partir del tejido embrionario inoculado en aves susceptibles, así como a partir de semen de gallos infectados. Sin embargo, el número de experimentos fue pequeño y el autor no considero de importancia la transmisión vertical.

Por otra parte Rispen (1969) informaron por primera vez que no fue posible detectar virus o anticuerpos fluorescentes en pollos criados en unidades de asilamiento, descendientes de padres que estaban infectados por el VEM. Tampoco fue posible de aislar el agente causal a partir de pollitos de un día de edad. Después, Solomon (1971) trato de aislar el VEM a partir de embriones de 16 días de edad, el 70% de los embriones eran producto de ponedoras con viremia. También celular de riñón de pollo de un día de edad sin detectar en ninguna de sus pruebas la presencia de VEM.

Estas publicaciones indican claramente que no existe transmisión vertical o que es de poca importancia.

Para buscar la fuente de transmisión se trato de infectar pollos con heces, hisopos tomados de la boca o nariz. Los resultados fueron positivos pero fallaron con el líquido sobrenadante del

material obtenido con el hisopo de la boca. Otra fuente es la cama de los pollos, se pensó en la posibilidad de que los escarabajos que viven en la cama (*Alphitobius diaperinus*) transmitan el virus (Eidson 1966), pero después se encontraron que la ausencia o presencia de escarabajos no tenía influencia en la transmisión de la enfermedad. Se encontró que el polvo presenta en las casetas es infectante durante 44 días, después la infectividad va a disminuir. Otros científicos también lograron transmitir la EM con descamación de piel. Con el hallazgo de que el pollo produce, el virus infeccioso en las células del epitelio folicular de las plumas se apoyó a estos estudios y se esclareció la transmisión por aerosoles. Con respecto al VEP se sabe que existe transmisión horizontal en los pavos y de estos a los pollos. La transmisión de pollo a pollo es muy rara y solamente parece ser posible en pollos muy susceptibles y libres de anticuerpos maternos. Hasta la fecha no se ha observado la transmisión del VHP en los huevos de los pavos. La producción de virus completo en pavos se realiza en la célula del epitelio folicular de las plumas, como sucede en el VEM en los pollos.

### **13. FACTORES PREDISPONENTE DEL HUÉSPED**

#### **13.1. Edad y sexo.**

Vielitz y Landgraf (1970) informaron que hay una íntima relación entre la edad de los pollos y la resistencia a la EM. Los estudios relacionados en pollos, revelaron que los pollos más resistentes al desarrollo de lesiones, cuando se infectaron a las 12 semanas de edad o más 22 aunque pollos infectados a una mayor edad presentaban viremia.

El mecanismo por medio del cual la edad interviene como factor importante para la presentación de la EM aun no se conoce sin embargo se piensa que posiblemente hay una regresión de las lesiones. Aparentemente la edad es un factor que contribuye a la resistencia

genética del ave contra la EM. Los pollos genéticamente resistentes no presentan lesiones, independientemente de la edad de infección, sucede lo contrario en las líneas susceptibles a la EM. Se ha observado que las hembras generalmente son más susceptibles a la EM que los machos, pero en la actualidad tampoco se sabe cuál sea la causa.

### **13.2. Anticuerpos maternos.**

Bajo las condiciones de campo las gallinas transmiten a los pollitos a través del huevo anticuerpos maternos contra la EM, que los protegen en forma parcial contra la infección (Spencer *et al* 1972). En los pollitos sin anticuerpos maternos la infección con el VEM puede producir lesiones degenerativas, especialmente en la bolsa de Fabricio causando mortalidad temprana (Jakowski 1969). Bajo la influencia de los anticuerpos maternos la viremia después de la infección no tiene un desarrollo tan rápido ni tan intenso.

### **13.3. Constitución genética.**

Desde 1947 (Hutt 1947) se conoce que existen líneas resistentes y líneas susceptibles a la EM. Esto fue confirmado después mediante pruebas de selección bajo desafío constante. Parece que la resistencia contra la EM es dominante, proviniendo de un número de genes relativamente bajo. Por otra parte otros investigadores no han observado una relación entre el cruzamiento de líneas y la resistencia obtenida.

Calnek *et al*, informo que existen diferencias en la producción de anticuerpos neutralizantes entre pollos de líneas susceptibles y líneas resistentes, además de que estos anticuerpos determinan que el pollo puede sobrevivir una infección, estos resultados fueron confirmados por otros autores.

#### **13.4. Factores predisponentes del virus.**

Como fue mencionado anteriormente, el tipo de virus que infecta al pollo determina si el pollo se enferma o no. Cuando entra primero una cepa patógena al pollo queda protegido contra una superinfección con una cepa virulenta.

#### **13.5. Factores predisponentes del ambiente.**

##### **13.5.1. *El estado de tensión.***

El estado de tensión, por ejemplo, el corte del pico y el traslado o movimiento del pollo afecta el desarrollo de la EM. Gross (1972) encontró también que algunas líneas de aves producían una gran cantidad de esteroides que las hacen más susceptibles a la EM. La incidencia de lesiones por EM se redujo con un bloqueador de esteroides, obtenido de las glándulas adrenales.

##### **13.5.2. *Asociación con otras enfermedades.***

Desde hace mucho tiempo se ha pensado que la coccidiosis toma influencia sobre la presentación de la EM (Biggs 1972). Sin embargo actualmente se sabe que la presencia de la EM en una parvada trae como consecuencia una baja de la resistencia de las aves a la coccidiosis. Se ha observado que la vacuna contra la EM puede disminuir la incidencia de la coccidiosis.

Se ha encontrado que la presencia del agente causal de la bursitis infecciosa hace que el VEM se manifieste en forma más virulenta (Cho 1970). La infección con el VEM o el VHP disminuye la respuesta de producción de anticuerpos contra *Mycoplasma sinoviae*, sin que ésta determine que los pollos sufran más lesiones en los sacos aéreos.

La vacunación simultánea con las vacunas contra EM y de la enfermedad de Newcastle no influye sobre el desarrollo de inmunidad contra ambas enfermedades. Por otra parte, cuando se

vacuna contra la EM y Viruela Aviar al mismo tiempo, la vacunación contra la EM no produce suficiente protección (Gentry 1974).

### **13.5.3. Alimentación.**

Se ha publicado que algunos ingredientes presentes en el alimento pueden influir en el desarrollo de las lesiones de la EM. Se ha encontrado que un exceso de vitamina A, en ocasiones, es responsable de lesiones más graves. También se ha demostrado que la adición de penicilina puede influir en el desarrollo de lesiones. Por último se informó en Florida, EUA., que la presencia de aflatoxinas B1 constituyen un factor desencadenante de la EM.

## **14. PERIODO DE INCUBACIÓN.**

El periodo de incubación de la EM inducida experimentalmente está de manera considerable bien establecido. Los pollitos inoculados al primer día de edad excretan virus comenzando aproximadamente dos semanas posteriores a la infección (PI) (Kenzy 1967), con diseminación máxima entre las semanas 3 y 5.

Las infecciones citolíticas de los 3 a 6 días PI son seguidas por lesiones degenerativas en órganos linfoides dentro del plazo de 6 a 8 días PI. Pueden encontrarse infiltraciones mononucleares en nervios y otros órganos después de cerca de dos semanas. Sin embargo, los signos clínicos y las lesiones macroscópicas por lo general no se presentan sino hasta las semanas 3 y 4.

Aunque estas cifras representan la incubación más corta, puede haber alguna variación considerable. Los mismos factores que influyen en la incidencia de la enfermedad también afectan al periodo de incubación. Éstos comprenden la cepa del virus, la dosis, el estado de los anticuerpos

maternos y la vía de infección, así como la edad, línea genética y sexo del huésped. La inducción de tumores dentro del 0 a 14 días después de inoculación de material celular es sugestiva de una respuesta de trasplante, si bien puede producirse muerte por un "síndrome de mortalidad temprana" tan pronto como de los 8 a 12 días PI.

Es difícil determinar el periodo de incubación de la enfermedad en condiciones de campo. A pesar de que a veces hay brotes en aves tan jóvenes como de 3 a 4 semanas, los casos más graves se inician después de las 8 a 9 semanas, y de ordinario es imposible determinar el momento y las condiciones de exposición. Purchase (1985), notó que los signos clínicos en las parvadas de ponedoras comerciales a menudo no se aprecian sino hasta las 16 a 20 semanas, y pocas veces tardíamente como hacia las 24 a 30 semanas. Nicholls (1984), corroboró un brote tan tardíamente como hacia la semana 60. La parálisis transitoria que afecta en ocasiones a las aves se desarrolla cerca de las 6 a 10 semanas.

## **15. PATOGENIA.**

Para comprender la patogenia de la EM se deben conocer las diferentes maneras de cómo actúa el VEM en el pollo. El virus actúa de acuerdo con la fase de la infección y al tipo de interacción entre virus y célula; en este sentido, se reconocen tres tipos generales de infección:

### **15.1. *Infección productiva y restrictiva.***

La infección productiva, se presenta en el epitelio folicular de la pluma; consiste en la producción de virus completo (envuelto), que tiene capacidad infectante. La infección productiva restrictiva se presenta en linfocitos, células epiteliales y en células de cultivo celular. Se caracteriza



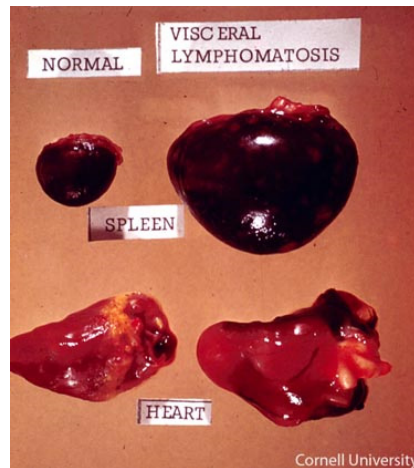
porque el virus ya desnudo (sin envoltura), ocasiona necrosis en células epiteliales de la bolsa de Fabricio, timo, bazo, hígado, nervios y ojo.



Figura 7. Inflamación de los folículos.



**Figura 8.** La bolsa de la izquierda tiene un tumor difuso participación de varios pliegues, con áreas focales de necrosis que no debe ser confundido con un tumor focal. La bolsa de la derecha es de un ave normal.



**Figura 9.** Comparación de un bazo normal y un bazo afectado por la enfermedad de Marek muestra un agrandamiento del bazo, así como las lesiones blanco característico linfoma dispersos por todo el órgano.



**Figura 10.** Infiltración de la enfermedad de Marek de los ojos. Un ojo normal se muestra en el centro para su comparación. Tenga en cuenta, los ojos de la izquierda y la derecha han iris de color claro y el iris / pupila es la forma irregular. Ambos hallazgos se relacionan con la infiltración linfocítica del iris.

### **15.2 Infección latente.**

Esta infección se presenta principalmente en LT y algunos LB. Se caracteriza por la formación del antígeno viral de membrana celular denominado MATSA (de las siglas en inglés de *Marek's disease tumor-associated surface antigen*).

### **15.3. Infección transformante.**

Este tipo de infección consiste en la transformación de linfoblastos (de origen LT) a un estado maligno, al producir los linfomas característicos de la EM. La patogenia de la EM producida por un virus muy virulento se caracteriza por la rapidez con que se presentan lesiones e inmunodepresión en los pollos. A continuación se describe la patogenia producida por un VEMvv (Figura 11).

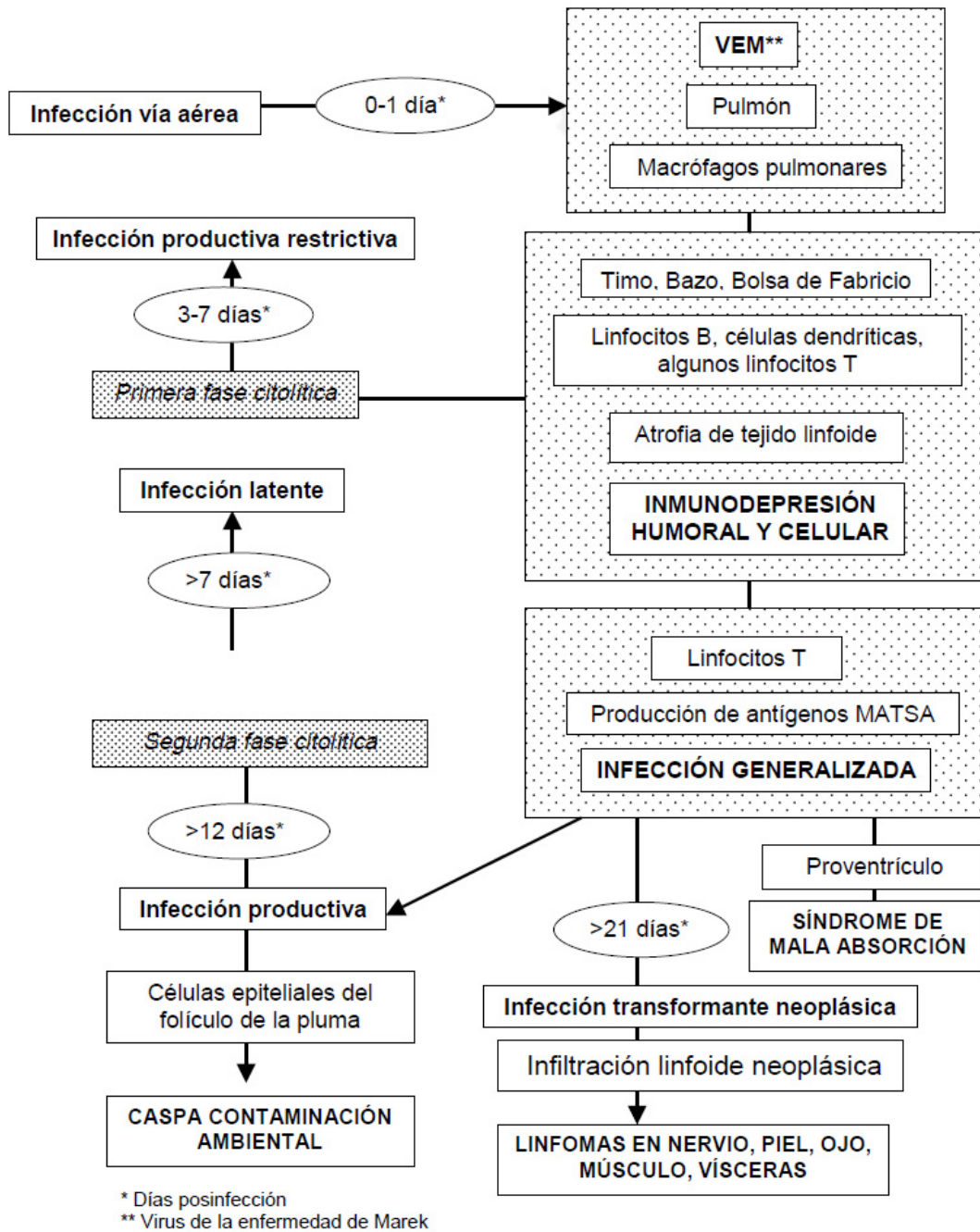


Figura 11. Patogenia de la enfermedad de Marek.

La vía de entrada principal del VEM es por vía respiratoria; el VEM al llegar al pulmón es fagocitado por macrófagos, los cuales transportan el virus a los órganos linfoides como timo, bazo y

BF. Esta viremia asociada con macrófagos se produce alrededor de 12 horas Pi. La infección de tipo productiva y restrictiva, que dura de tres a siete días Pi, se lleva a cabo en los órganos linfoides, y se caracteriza por la producción de partículas virales incompletas. En esta fase, las células blanco son principalmente los LB (IgM e IgA positivos). Los principales hallazgos histológicos de esta fase son necrosis (citólisis de LB), con infiltración de macrófagos, granulocitos e hiperplasia de células dendríticas, por lo que la bolsa de Fabricio y el timo se atrofian. Aunque el timo sólo cuenta con 10% de LB también se atrofia, debido a que el virus también ataca, en esta fase, a algunos LT. Además se observa esplenomegalia, a pesar de existir atrofia linfoide esplénica.

La esplenomegalia es causada por la hiperplasia de células dendríticas. La necrosis y posterior atrofia linfoide causan inmunodepresión permanente humoral y celular. Los hallazgos histopatológicos de esta fase de la infección no pueden diferenciarse de los ocasionados en la fase aguda de IBF. Todos estos eventos se conocen como primera fase citolítica.

Después del séptimo día Pi, ocurre un cambio drástico en el tipo de infección, donde cambia de productiva y restrictiva a latente. En la fase latente, las células blanco son principalmente los LT activados y algunos LB. En este periodo aparece el antígeno MATSA en bazo, bolsa de Fabricio y timo; además se presenta viremia asociada con células, por lo que se piensa que los LT activados son los responsables de la diseminación de la infección al resto del organismo. En ese momento el virus ya no requiere de linfocitos para su replicación, pues ésta replicación se puede dar en células epiteliales del folículo plumoso, epidermis, proventrículo, riñón, páncreas y adrenal. En proventrículo causa necrosis glandular y engrosamiento de la mucosa, lo que produce mala digestión y resulta en un síndrome de mala absorción. Este síndrome se caracteriza por parvadas disparejas con pollos pequeños y en estado de caquexia.

Al final de la infección latente y posterior a los 12 días Pi, se presenta una segunda fase citolítica en los órganos linfoides; al mismo tiempo, se puede apreciar infiltración mononuclear en los nervios. Posteriormente inicia la infección productiva, en la que se produce infiltración linfocitaria periférica a los folículos plumosos; además, los epitelocitos de la dermis y folículo plumoso presentan cuerpos de inclusión intranucleares. Los cuerpos de inclusión están compuestos por viriones completos; estos viriones son las partículas infectantes que son liberadas al ambiente en la caspa cutánea o plumosa.

La última etapa de infección es de tipo transformante y consiste en la presencia de alteraciones neoplásicas de los LT. Este tipo de células se puede encontrar a partir de los 21 días Pi, pero es más común que se hagan patentes hacia la sexta u octava semanas Pi. Las neoplasias causadas por el VEM se caracterizan de estar constituidas principalmente por LT pleomórficos, LB, macrófagos y células plasmáticas.

Las principales diferencias entre la patogenia de VEM<sub>vv</sub> y VEM<sub>vv+</sub>, es que los VEM<sub>vv+</sub> producen viremia dentro de las 12 horas Pi, mientras que los VEM<sub>vv</sub> necesitan más de 12 horas. Además los VEM<sub>vv+</sub> pueden producir signos clínicos a los 10 días Pi, así como neoplasias y engrosamiento neural a los 12 días Pi. En contraparte, los VEM<sub>vv</sub> producen signos clínicos y lesiones alrededor de la cuarta semana.

Recientemente se han aislado otras cepas del VEM que producen infiltración linfocítica pleomórfica en encéfalo, retina, iris y vísceras, sin presentar lesiones en nervios periféricos. La edad de presentación de este tipo de EM es a partir de las 20 semanas de edad.

## 16. SIGNOS

Múltiples investigadores han descrito signos relacionados con la EM, como se presenta en la revisión de Biggs., *et al.* En general, son aquellos relacionados con paresia progresiva asimétrica y, más adelante parálisis completa de una o más de las extremidades (figura 12). Como pueden afectarse uno o varios nervios, los signos varían de ave a ave. La afectación del ala se caracteriza por la caída del miembro. Si se dañan los nervios que controlan a los músculos del cuello, la cabeza puede estar inclinada hacia abajo y puede haber cierto grado de tortícolis. La afectación vagal puede provocar parálisis y dilatación del buche, o jadeo, o ambas cosas.



**Figura 12.** Daño en el musculo del cuello y paresia unilateral de las patas.

Como las perturbaciones locomotoras se reconocen con facilidad, la incoordinación y la marcha titubeante pueden ser los primeros signos observables. Una actitud en particular característica es la del ave que tiene una pata estirada hacia adelante y la otra hacia atrás como

resultado de paresia unilateral o parálisis de la pata. Un síndrome de parálisis pasajera relacionado con la EM, se ha descrito y reproducido, aunque se ha observado con poca frecuencia desde que se practica la vacunación; las aves afectadas muestran grados variables de ataxia y parálisis corporal parcial o total, empezando 8 a 12 días después de la inoculación del virus y persistiendo. Con los brotes agudos de EM, el síndrome es mucho más explosivo y se caracteriza al inicio por una elevada proporción de aves con depresión intensa. Unos cuantos días después, algunas de ellas, pero no todas, desarrollan ataxia y parálisis unilateral o bilateral subsecuente de las extremidades; otras más pueden morir sin enfermedad clínica extensa.

Muchas aves se deshidratan y entran en coma. Puede producirse ceguera como resultado de la afectación del iris. Los ojos afectados pierden de manera gradual su capacidad para acomodarse a la intensidad de la luz. El examen clínico también muestra cambios que varían desde una despigmentación anular concéntrica o un borramiento azulado difuso hasta opacidad grisácea difusa del. Al principio, la pupila se vuelve irregular, y en etapas avanzadas sólo es una pequeña abertura puntiforme.



**Figura 13.** Algunas aves con la enfermedad de Marek pueden presentar diarrea.

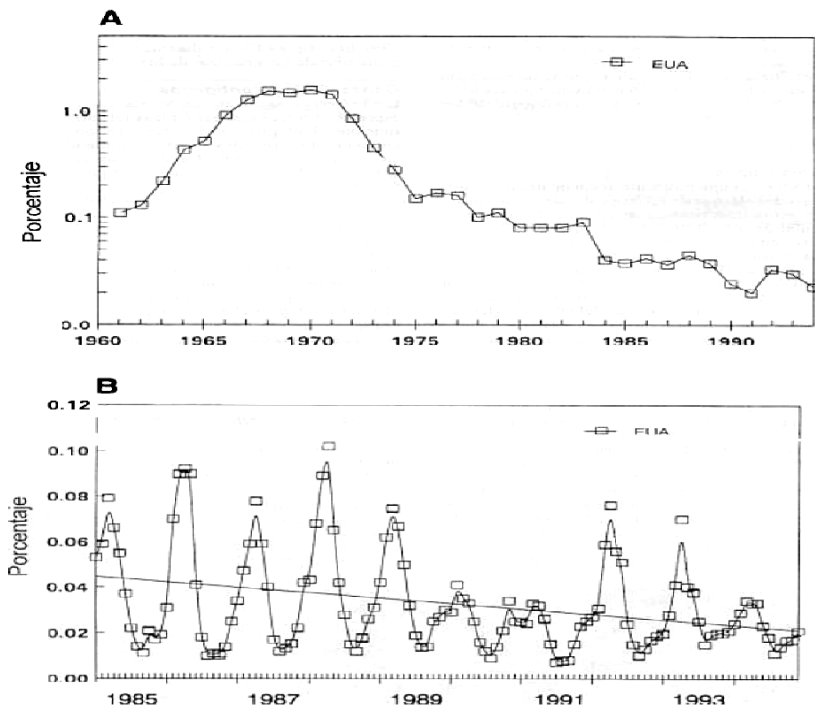
Pueden observarse signos inespecíficos tales como pérdida de peso, palidez, anorexia y diarrea, en especial en aves en las cuales el curso es prolongado.



Bajo condiciones comerciales, la muerte a menudo se origina por inanición y deshidratación a causa de la incapacidad por alcanzar alimentos y agua, o en muchos casos por pisoteo de sus semejantes. Durante 1 a 2 días. Muchas de las aves afectadas se pueden recuperar, sólo para morir pocas semanas después por EM clínica. Parece ser que el síndrome es resultado de edema cerebral vasógeno.

## **17. MORBILIDAD Y MORTALIDAD.**

La incidencia de la EM es muy variable. Unas cuantas aves que desarrollan signos pueden recuperarse de la enfermedad clínica (Biggs., *et al* 1967), pero en general, la mortalidad es casi igual a la morbilidad. Con anterioridad al uso de vacunas, las pérdidas en los criaderos afectados se estimaban dentro de los límites desde unas cuantas aves a 25 o 30% y en ocasiones hasta de 60%. En la actualidad, se vacunan contra la EM entre 95 y 100% de las aves ponedoras y esto ha reducido las pérdidas a menos de 5% en la mayor parte de los países. Los criaderos de pollos de engorda, que se vacunan en algunas naciones, pero no en otras, pueden presentar pérdidas de 0.1 a 0.5% y decomisos de 0.2%, o más, aunque el índice de decomiso promedio en EUA ha sido mucho menor, alcanzando menos de 0.04% en 1994 (Figura 14).



**Figura 14.** Decomisos en EUA, en pollos de engorda jóvenes por enfermedad de Marek. A. Promedios anuales de 1960 a 1994. B. Promedios mensuales de 1985 a 1994. (Datos del National Agriculture Statistics Service.)

Luego de que aparece la enfermedad, la mortalidad se acumula gradualmente y persiste por lo general durante 4 a 10 semanas. Los brotes se desarrollan en parvadas aisladas, o en ocasiones en varias parvadas en una región o en una sucesión de parvadas en una granja.

Varios factores influyen en el grado de pérdidas en las parvadas afectadas. Éstos se refieren ya sea al agente infectante o al huésped. Los que están relacionados de manera específica al agente son la cepa del virus, la dosis y la vía de exposición. Las cepas de virus relacionadas con brotes agudos de EM son más virulentas y ocasionan una incidencia más elevada de la enfermedad y más linfomas viscerales, que las relacionan con la llamada manifestación clásica de ésta. En ciertos brotes, la alta incidencia de lesiones oculares parece relacionarse con las cepas del virus. El grado de patogenicidad (morbilidad y mortalidad) y el espectro de las lesiones, dependen así

parcialmente de la cepa del virus. No obstante, la virulencia de cierta cepa depende a su vez en parte de la constitución genética del huésped.

La dosis puede representar un factor bajo condiciones naturales, aunque se encontró que fue máxima la respuesta de la EM en aves genéticamente susceptibles que recibieron virus virulento, aun cuando se inoculó una dilución limitada del virus. La dosis puede ser más significativa en huéspedes desde el punto de vista inmunocompetente (aves resistentes genéticamente que han adquirido resistencia por la edad) en aves vacunadas o con virus de menor virulencia.

La vía de exposición es probable que actúe de igual manera; las vías menos eficaces pueden disminuir la dosis eficaz para el ave. Los factores de influencia del huésped comprenden al sexo, anticuerpos pasivos, constitución genética y edad. Biggs., *et al* 1965, citó varios estudios en los cuales se observó que había mayores pérdidas en hembras que de machos; su mayor susceptibilidad se manifestó en un periodo de latencia más corto. Parece que la diferencia no se debió a hormonas sexuales, resultó más sobresaliente con líneas susceptibles de pollos, y sólo fue aparente en el caso de infección con los virus aislados más virulentos (vMDV).

El anticuerpo pasivo reduce la mortalidad por EM, los signos clínicos de parálisis transitoria y el síndrome de mortalidad temprana, probablemente limitando la propagación del virus en los tejidos durante los primeros días luego de la exposición (Calnek., *et al* 1973). Tanto los factores genéticos como la edad son importantes para determinar el nivel de morbilidad y mortalidad probable que la respuesta inmunitaria del huésped a la infección es el evento más significativo, y que ésta constituye una base común a la que se ha denominado "resistencia genética" o "resistencia por edad". De hecho, probablemente estos dos tipos son lo mismo, ya que la resistencia relacionada con la edad

puede vincularse por lo general con líneas resistentes genéticamente y en un grado mucho menor con líneas susceptibles.

En estudios que comparan cepas genéticas la resistencia se correlacionó con el desarrollo de anticuerpos neutralizantes del virus, y retención de funciones inmunitarias mediadas por células. Esto resultó en un ahorro en la competencia inmunitaria en el caso de las aves resistentes, más que por una diferencia inherente entre las líneas. Se ha identificado que la regresión de la lesión se basa en la resistencia relacionada con la edad; el éxito de la timectomía y radiación X, pero la falla con la bursectomía para evadir la resistencia, indica que la inmunidad celular es el factor mediador. Otros mecanismos de resistencia que pueden influir de manera concebible en la incidencia de la morbilidad y la mortalidad de la EM incluyen la producción de interferón y la actividad de las células asesinas naturales (NK). Las variaciones en la presencia de EM, no explicadas por otros mecanismos, pueden deberse al hecho de que algunas parvadas experimentan infecciones naturales con el serotipo 2 del MDV, y así brindan protección contra las cepas oncógenas (Jackson 1976).

Se ha afirmado que varios factores ambientales e infecciones concurrentes afectan la incidencia de la EM. *Gross., et al (1972)*, observó aumento en la incidencia entre pollos sometidos a un alto grado de estrés social (o seleccionados por concentraciones elevadas de corticosterona en el plasma), y *Powell y Davison., et al (1986)*, mostraron que la administración de corticosteroides a pollos infectados de manera latente, precipitó la presencia de EM clínica. Esto pudo relacionarse con una reactivación de la infección, la cual se ha observado que se presenta después de la inmunosupresión. La reducción en la ingestión de alimentos demoró y redujo la incidencia, y la selección de pollos para un índice rápido de crecimiento pareció relacionarse con aumento en la

susceptibilidad. La infección concurrente con criptosporidia o virus inmunosupresores, por ejemplo, el virus de la anemia infecciosa aviar, también puede aumentar la gravedad de MD.

## **18. HALLAZGOS MACROSCÓPICOS.**

Existen cinco presentaciones tumorales de la EM, sus principales características son las siguientes:

### **18.1. *Presentación cutánea.***

Se caracteriza por el aumento de tamaño del folículo de la pluma. Las lesiones cutáneas se observan con más frecuencia en la región crural externa y en el pterilo dorsal cervical. Esta presentación es común en pollos de engorda de ocho a nueve semanas de edad en el momento del sacrificio. Probablemente afecte con igual frecuencia a las gallinas de postura, pero como es una lesión reversible, ésta ya no se observa cuando la gallina es sacrificada (Figura 15).



**Figura 15.** Folículos de la pluma.

### 18.2. Presentación visceral.

Tumores linfoides en ovario, pulmón, corazón, mesenterio, riñón, hígado, bazo, adrenal, páncreas, proventrículo e intestino. Las neoplasias se pueden presentar desde las cuatro semanas de edad y pueden ser difusas: con aumento de volumen y palidez del órgano afectado, o localizadas: Con nódulos de color blanco marfil o blanco grisáceo bien delimitados. Estas lesiones son idénticas a las de la leucosis linfóide (LL) y no es posible hacer una diferenciación entre EM y LL basada sólo en las lesiones macroscópicas en vísceras.

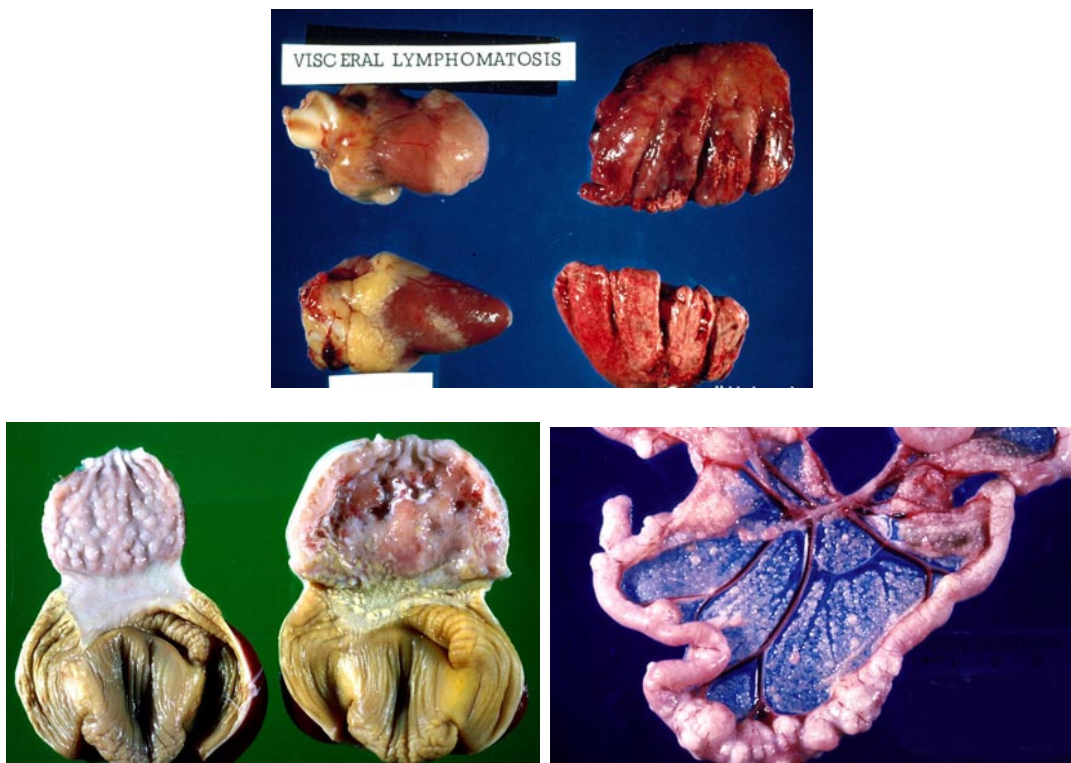


Figura 16. Linfomatosis visceral.

Los tumores viscerales son comunes en presentaciones agudas de EM y se pueden observar aun en ausencia de la lesión nerviosa. En particular la pared del proventrículo se engrosa y

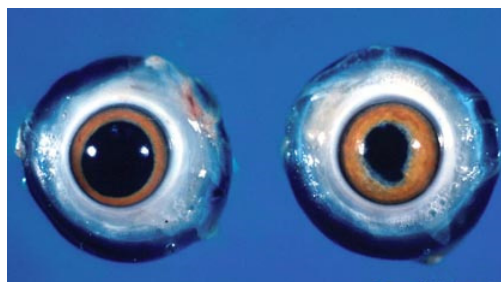
tiene consistencia firme; en casos graves se forman nódulos, úlceras (Figura 14), hemorragias petequiales o equimóticas. La bolsa de Fabricio se atrofia y en raras ocasiones se le desarrollan tumores; sin embargo, cuando esto ocurre, tienen apariencia difusa debido a la distribución interfolicular de los linfocitos tumorales. Esta lesión difiere de los tumores nodulares característicos de la leucosis linfoide, los cuales se diferencian fácilmente por histología.

### **18.3. Presentación muscular.**

Es poco frecuente, afecta aves jóvenes y adultas. Se caracteriza por las presentaciones de tumores linfoides que pueden ser difusos o nodulares, con localización superficial profundas o ambas, principalmente en músculos pectorales (pechuga).

### **18.4. Presentación ocular.**

Se caracteriza por ocasionar iridociclitis, que es la despigmentación del iris (ojo gris) y distorsión pupilar, ocasionadas por una infiltración de células tumorales en los nervios ópticos. Esta es la lesión más frecuente en gallina en desarrollo y postura (Ficken 1991)



**Figura 17.** Lesión ocular.

### 18.5. *Presentación neural.*

Es la más característica desde el punto de vista clínico, pero se observa sólo de 20% a 40% de las aves enfermas; según sea la cepa viral, se puede observar macroscópicamente desde las seis semanas de vida. La gran mayoría de los casos pueden diagnosticarse, examinando los plexos celiaco, mesentérico, craneal, bronquial y ciático (Figura 16), los nervios de Reimack y el gran esplénico. En los nervios afectados se observa pérdida de las estriaciones, cambio de color de perlado a gris amarillento y algunas veces edema.

La lesión más característica es el engrosamiento de los nervios periféricos, de los ganglios nerviosos espinales o de ambos. El engrosamiento puede ser localizado o generalizado. Los nervios pueden alcanzar de dos a tres veces su grosor normal o incluso más. Las lesiones con frecuencia son unilaterales, por lo que es conveniente examinar los nervios de ambos lados para determinar cambios y revisarlos cuidadosamente en toda su longitud, ya que el engrosamiento puede variar de un punto a otro.



**Figura 18.** Linfomatosis neural.



## 19. HALLAZGOS HISTOLÓGICOS

Las lesiones histológicas características de la EM son infiltración de linfocitos pleomórficos (linfoma), células plasmáticas y macrófagos. Los linfocitos pleomórficos se caracterizan por su alto grado de anisocitosis y anisonucleosis. Los linfocitos con núcleos grandes presentan la cromatina muy laxa con nucléolos muy aparentes. También se pueden encontrar células de Marek, características de esta enfermedad. Estas células son grandes con citoplasma basofílico vacuolado y núcleo vesicular, pleomórfico, basofílico oscuro con nucleolo muy aparente (Figura 19). Esta infiltración monocítica se puede encontrar en los órganos afectados por las cinco presentaciones macroscópicas de la EM. De las cinco presentaciones, el tejido nervioso ha sido el más estudiado histológicamente y se le han encontrado dos procesos: infiltrado linfoide pleomórfico y desmielinización.

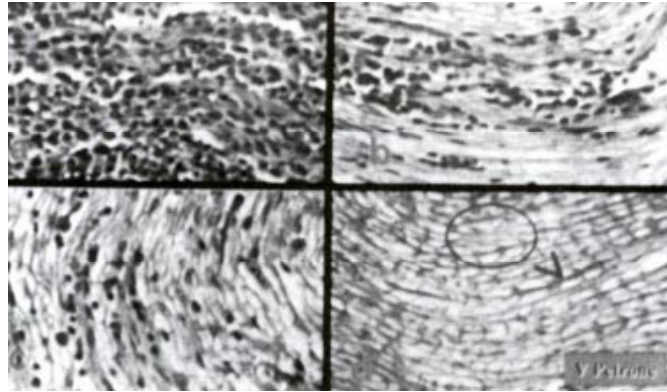


**Figura 19.** Infiltración de células mononucleares en nervio. Célula de Marek (M), macrófago (my), célula plasmática.

En encéfalo el infiltrado linfoide se presenta perivascular, mientras que en los nervios, Payne y Biggs., *et al* (1967) realizaron una clasificación simple de las lesiones según su grado.

### 19.1. Lesión tipo A.

Caracterizada por infiltración masiva de linfoblastos y linfocitos pequeños y medianos; algunas células de Marek, desmielinización leve y en ocasiones proliferación de células de Schwann (Figura 20).



**Figura 20.** Tipos de lesiones histológicas en nervio (HE, 400x): a) Tipo A, abundante infiltrado linfoide. b) Tipo B, infiltrado linfoide moderado. c) Tipo C, infiltrado linfoide leve. d) Tipo C, degeneración axonal (flecha) y desmielinización (círculo)

### 19.2. Lesión tipo B.

Caracterizada por separación de fibras nerviosas por exudado seroso o edema, así como infiltrado moderado de linfoblastos, linfocitos pequeños, células plasmáticas y algunas células de Marek. Además de desmielinización y proliferación de células de Schwann.

### 19.3. Lesión tipo C.

Este tipo de lesión es la forma leve del tipo B. Además de los hallazgos neoplásicos descritos, se pueden encontrar otro tipo de lesiones no neoplásicas. Algunas de éstas son: Cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos o anfofílicos en los epitelocitos de la epidermis; necrosis y metaplasia columnar del epitelio de las glándulas proventriculares, aunado a la atrofia glandular e

infiltrado de linfocitos pleomórficos, heterófilos y macrófagos; necrosis y posterior atrofia del tejido linfoide de bolsa de Fabricio, timo y bazo. En bazo se presenta hiperplasia severa de las células dendríticas.

## 20. PATOGÉNESIS.

En muchos laboratorios se han estudiado extensamente los hechos secuenciales de la EM. Se han publicado múltiples repasos extensos éstos deben ser consultados para obtener detalles de un número grande de contribuciones que proporcionan el conocimiento actual de la EM.

También Venugopal y Payne., *et al* (1995), proporcionaron de manera reciente una revisión excelente, respecto a ciertos eventos patogenéticos de las características biológicas moleculares de la infección.

Pueden delinearse cuatro fases de infección in vivo:

- 1) De virus productivo-restrictivo temprana causante de alteraciones degenerativas primarias,
- 2) latente, 3) una segunda fase de infección productiva-restrictiva coincidente con inmunosupresión permanente, y 4) una fase proliferativa que afecta a células linfoides infectadas no productivamente que puede, o no, avanzar hasta el grado de formación de linfoma.

El virus penetra al organismo a través de las vías respiratorias donde es probablemente captado por las células fagocíticas. Poco después puede detectarse infección citolítica en el bazo, bolsa de Fabricio y timo, alcanzando su intensidad máxima de los 3 a 6 días. Sheky y colaboradores descubrieron que las células blanco primarias en todos los tres órganos consistieron en células B, aunque también se infectaron algunas células T activadas y presentaron degeneración (Shek 1983).

Las células T en reposo son refractarias a la infección. Los efectos necrotizantes de esta infección temprana provocan una reacción inflamatoria aguda con infiltración de varias células incluyendo macrófagos, granulocitos y linfocitos tanto inmunológicamente comprometidos como no comprometidos. Puede producirse después una respuesta hiperplásica del bazo, y hacia cerca de siete días puede presentarse una inmunosupresión transitoria a causa de la presencia de macrófagos supresores. Finalmente, puede haber atrofia de bolsa y timo. Los pollos de líneas susceptibles y líneas resistentes de distintas edades son igualmente susceptibles a la infección, Y la intensidad de infección en todas las aves es por igual elevada en todos los casos durante el periodo citolítico temprano (Fabricant 1977). No obstante, la patogenicidad de la cepa viral puede afectar la intensidad de la infección temprana. Witter y colaboradores., *et al* (1980), comunicaron que cepas de MDV más altamente oncógenas, como la Md5, pueden provocar una atrofia de órganos linfoides más intensa que las cepas menos oncógenas, y ocasionar un síndrome de muerte temprana como resultado de una infección citolítica en especial manifiesta. Hacia los 6 a 7 días, la infección cambia a latencia coincidiendo con el desarrollo de respuestas inmunitarias. Se ha observado que la inmunidad mediada por células (IMC) es importante en el cambio, quizá por medio de un mediador soluble. La mayor parte de las células infectadas de manera latente son células T infectadas, aunque también pueden estar implicadas células B.

La infección latente es persistente y puede durar toda la vida del ave. Se desconoce el grado al cual también están infectadas latentemente las células no linfoides, aunque aparentemente se ha observado infección latente en células de Schwann y en células satélites en los ganglios raquídeos. La infección en aves genéticamente resistentes, a menudo no progresa más allá de la segunda fase (latencia), aparte de una infección productiva persistente en grado bajo en la FPL. A pesar de ello, las aves susceptibles desarrollan una segunda onda de infecciones citolíticas después de 2 a 3

semanas, que coincide con inmunosupresión permanente. Los órganos linfoides son afectados de nuevo, y pueden encontrarse focos de infección en tejidos de origen epitelial y en varios órganos viscerales (ejemplo, riñón, páncreas, suprarrenal, proventrículo, etcétera) en especial en la piel, donde se nota una involución notable del epitelio del folículo de la pluma. Esta última resulta singular, ya que es el único sitio conocido de replicación completa del virus. Hay necrosis focal y reacciones inflamatorias alrededor de las áreas infectadas. La extensión de la infección durante esta fase (a diferencia de la fase temprana en los órganos linfoides) depende de factores que se sabe regulan la incidencia de tumores; las aves más susceptibles desarrollan las infecciones más intensas y generalizadas.

La causa de las lesiones inflamatorias del SNC relacionadas con la parálisis transitoria inducida por MDV no está clara, pero se sabe que siempre se encuentra bajo el control de genes del complejo de histocompatibilidad mayor, y que se requieren células B para su inducción. Las alteraciones linfoproliferativas que constituyen la respuesta final en la enfermedad pueden avanzar a desarrollo tumoral, aunque se produce comúnmente regresión de las lesiones ya sea antes o después de que sean aparentes los linfomas francos. La muerte a causa de linfomas puede suceder en cualquier momento a partir de casi la tercera semana. La composición de los linfomas es compleja; está constituida por una mezcla de células neoplásicas o inflamatorias e inmunológicamente activas. Hay tanto células T como B, aunque predomina la primera (Hudson 1973).

Por lo general, las células blanco para la transformación son CD4+, células T activadas, presumiblemente células T colaboradoras. No obstante, si se modifican experimentalmente las condiciones de la infección, es posible demostrar que es transformable una variedad de subgrupos

de células T, incluyendo células CD4+, CD8+, y CD4-/CD8-, y se ha informado tanto de tumores de EM de células B y de células T de pavos. Aunque la célula transformada parece ser una célula T colaboradora, las células tumorales tienen la capacidad para suprimir ciertas pruebas in vitro de competencia IMC, tal como la estimulación mitógena de células esplénicas y la actividad de las células NK. La infección en las células transformadas es en gran parte, pero no por completo, no productiva in vivo e in vitro. Un antígeno normal (MATSA), que se encuentra en algunas poblaciones de células T activadas no infectadas (McColl 1987), puede ser un marcador expresado en los blancos de transformación, ya que se encuentra presente en las células tumorales de EM. Los linfomas de la enfermedad de Marek en algunas líneas de pollos, pero no en todas, contienen células que expresan antígeno fetal aviar, indicando que el grado de dediferenciación de las células tumorales varía entre cepas. Algunas líneas celulares linfoblastoides de EM de pavo (Nazerian 1985), se han identificado como células B, y otros como células T. En la sección Etiología se puede encontrar más información acerca de las células transformadas.

Se ha propuesto la posibilidad de que los tumores de EM sean de origen clonal, con base en observaciones al azar de la integración del DNA de MDV en los genomas de las células de linfoma. A pesar de que la integración fue al azar, resultó consistente el patrón de los sitios de integración entre las células para algún linfoma o alguna línea celular derivada del linfoma. Esta investigación tiene implicaciones fundamentales respecto a la patogénesis de EM, pero espera confirmación y mayor definición. Por otro lado, los estudios iniciales por Schat y colaboradores., *et al* (1991), muestran con claridad que distintos linfomas en la misma ave pueden originar líneas celulares representando diferentes fenotipos de células T, con base en marcadores de superficie CD y receptores de células T.

Los estudios efectuados acerca de las reacciones de injerto contra huésped en distintas líneas genéticas, llevaron a Longenecker (1976) y Pazderka (1974) a sugerir que se encuentran relacionadas muy de cerca la competencia aloinmunitaria baja, y la resistencia a la EM, a través de enlace genético o dependencia funcional. Esto suscitó la especulación de Schat y colaboradores *et al* (1982), Y Calnek., *et al* (1979) de que la activación de las células como respuestas a la infección necrotizante de células B actúa como un evento muy significativo en la patogénesis al proporcionar un aporte abundante de células que son células blanco ordinarias para la transformación. Esto ha surgido con base en los estudios de Calnek que muestran que la inducción del tumor en el sitio de inoculación con MDV aumenta ocasionando una reacción de IMC contra las células alogénicas en el sitio.

Es razonable que la transformación requiera de: 1) susceptibilidad a la infección, 2) control intrínseco o extrínseco de la replicación del virus (latencia), 3) división celular para integrar al genoma del virus, y 4) expresión de oncogenes virales o activación de oncogenes celulares. Las células T activadas al momento en que las respuestas de la IMC ocasionan un cambio a latencia, pueden corresponder a este modelo. Es interesante señalar que las células presentes, tan pronto como a los cuatro días posteriores a la inoculación de células de riñón alogénico infectadas con MDV, pueden crecer *in vitro* como líneas celulares de EM. Así, las células transformadas, o por lo menos, las células blanco para transformación, aun están presentes durante la fase temprana citolítica de la EM.

La patogénesis de la infección con MDV oncógenos que se ha atenuado por paso *in vitro* la han estudiado Bradley, Frazier, y Schat y colaboradores (1985). Ambos grupos hallaron que el virus atenuado no originó infección citolítica de órganos linfoides, y que los valores de viremia



relacionados con células fueron bajos. Ambos grupos comprendieron además que el virus atenuado no resultó infeccioso para linfocitos in vitro, explicando quizá las observaciones in vivo.

La vacunación altera la patogénesis de la infección de MDV mediante la disminución o eliminación de la fase citolítica temprana. Asimismo, se reduce notablemente el grado de infección latente con MDV y no se desarrollan ni la infección citolítica tardía ni la inmunosupresión. No se conocen el mecanismo o los mecanismos actuales mediante los cuales se altera la patogénesis en el caso de la resistencia del huésped. No obstante, la IMC probablemente está implicada, y hay evidencias que sugieren que las respuestas inmunitarias del huésped pueden estar dirigidas contra ya sea los eventos virológicos tempranos o la fase proliferativa tardía, y de que una respuesta eficaz en cualquier etapa puede reducir la probabilidad de enfermedad franca. Tanto la edad como la resistencia genética, dependen de la competencia inmunológica. Tal vez sea importante también la disponibilidad de células blanco apropiadas. Si la hipótesis de que el desarrollo del tumor aumenta por una respuesta fuerte de célula T contra la infección citolítica temprana de células B, entonces los factores que limitan la respuesta deben reducir la incidencia del tumor. Tanto la inmunidad por vacuna como la bursectomía embrionaria suprimen la infección viral activa, obviando de esa manera la respuesta inflamatoria; ambas reducen la incidencia de tumores.

Además, se piensa que cuando menos una línea genética (línea 6) es resistente a la EM debido a la escasez de células T blanco. Es interesante señalar que hay evidencia de que algunas líneas genéticas que tienen respuestas de IMC en particular intensas, son en especial susceptibles a la EM, aunque esto no es verdadero en todos los casos.

Las cepas virales difieren en oncogenicidad, pero las diferencias en las patogénesis relacionadas con las líneas no están bien definidas. Asimismo, ocasionan infecciones citolíticas

tempranas similares. Tanto la línea genética como la cepa de virus están implicadas en la determinación de la distribución, así como en la incidencia de linfomas. La respuesta inmunitaria en sí puede ser causante de algunas lesiones típicas de la EM. Las lesiones nerviosas tienen ciertas características sugestivas de una enfermedad autoinmunitaria, y se ha identificado a la EM como un modelo para el síndrome de Landry-Guillain-Barré. Pruebas adicionales que señalan hacia un componente autoinmunitario para EM, provienen de estudios que demuestran complejos inmunitarios en los riñones de pollos y codornices infectados con MDV. No se conoce la patogénesis de las lesiones ateroscleróticas.

## **21. INMUNIDAD.**

La importancia de la respuesta inmunitaria en la EM no puede exagerarse. La preocupación tiene cuatro aspectos:

- 1) La EM puede ser inmunosupresora,
- 2) La respuesta inmunitaria probablemente sea la base de la resistencia en la EM,
- 3) La inmunidad por vacuna es el medio principal de control,
- 4) La respuesta inmunitaria puede contribuir a la masa celular del linfoma. Las respuestas inmunitarias y las características de inmunosupresión de la EM están bien documentadas y analizadas. Para los detalles deben considerarse los diversos casos.

### **21.1. Inmunosupresión**

El deterioro de la respuesta inmunitaria puede originarse de manera directa por infección con MDV, a través de la infección lítica de linfocitos, o indirectamente por medio de la actividad de poblaciones de células supresoras (Theis 1977). Es probable que ambas sean importantes. Estudios *in vitro* sugieren que las células tumorales de MD podrían tener por sí mismas actividad supresora.

Esto podría deberse a que son células T supresoras reales o, tal vez, debido a que expresan antígeno fetal aviar del cual se ha demostrado que posee cierta actividad supresora. Los estudios de Schat *et al*, y colaboradores, que muestran que las líneas celulares tumorales portan un antígeno CD4, un marcador para las células T colaboradoras, argumentan en contra de lo último, pero de cualquier manera falta la evidencia directa. La inmunosupresión permanente tiende a correlacionarse con el desarrollo final del tumor y sólo se puede observar en aves que ya han desarrollado neoplasias; de este modo, resulta difícil distinguir entre la causa y el efecto. Por general, la primera aparición de la inmunosupresión permanente coincide con la segunda fase de infección citolítica. Ya que se requiere de la inmunocompetencia para que se conserve la latencia, podría ser que la inmunosupresión relacionada con la aparición de linfoblastos transformados resulte en la pérdida de células T y B adicionales por medio de la infección citolítica, mezclando de esta manera la situación y resultando en la atrofia bursal y tímica observada en aves destinadas a fallecer por EM.

Durante el ciclo de postura, debe considerarse una posible relación entre la inmunosupresión, la reactivación de la infección citolítica y los brotes de EM. La inmunidad tanto humoral como mediada por células pueden ser deprimidas por la EM, cual se refleja en reducción de la respuesta de anticuerpos a diversos antígenos y por alteraciones en las funciones de la célula T, tales como rechazo de injerto de piel, estimulación de linfocitos por mitógenos, hipersensibilidad tardía, reducción en la actividad de la célula NK, y regresión alterada del sarcoma de Rous.

La infección por MDV puede aumentar la susceptibilidad a la infección primaria y secundaria con coccidias. Debe enfatizarse que aunque pueda haber depresión, no hay una pérdida total de función.

Hacia los siete días PI se observa una depresión transitoria en la inmunidad celular, mediada por la respuesta in vitro a los mitógenos, independientemente de la constitución genética o virulencia de la cepa de virus. Esto parece que se debe a una población de macrófagos supresores.

### **21.2. Respuestas inmunitarias.**

Se desarrollan inmunidad tanto humoral como mediada por células en aves competentes después de la infección con MDV. Éstas pueden suponer varios tipos de respuestas, y dirigirse contra diversos antígenos. Payne *et al*, especula que la inmunidad hacia EM podría ser, ya sea al principio contra la infección viral o después contra las células linfoides proliferantes. De hecho, pueden utilizarse antígenos virales inactivados o tumorales para inmunizar contra la EM.

Las vacunas antivirales inactivadas protegen contra las infecciones citolíticas tempranas, infecciones latentes y formación de tumores, mientras que las vacunas de células tumorales muertas sólo evitan lo último. Una excepción fue una vacuna inactivada de MDV en emulsión de aceite, de la cual se informó que inducía anticuerpos no neutralizantes de virus, lo que podía inmunizar pollos de manera pasiva contra la infección MDV y sus efectos relacionados con el virus, pero no contra el desarrollo posterior de tumores.

### **21.3.- Inmunidad humoral.**

Pueden detectarse anticuerpos precipitantes y neutralizantes de virus (N V) dentro de un plazo de la 2 semanas; una respuesta de inmunoglobulina M (IgM) es sustituida por IgG. Estos anticuerpos por lo general persisten durante toda la vida del ave. Los anticuerpos NV pero no precipitantes de virus, se correlacionan con la supervivencia de las aves infectadas. Es probable que

éste sea un efecto más que una causa, y puede ser el resultado del ahorro del sistema dependiente de bolsa en las aves resistentes.

Se ha observado una función protectora desempeñada por el anticuerpo humoral adquirido de manera pasiva en pollitos; el efecto del anticuerpo no es excluir, sino reducir la intensidad de la infección, quizás impidiendo la propagación. Puede producirse neutralización del virus in vivo; sin embargo, se desconoce el mecanismo exacto. No se requiere de una respuesta humoral de anticuerpos para la resistencia contra la EM, ya que las aves bursectomizadas pueden sobrevivir a la infección. Esto no excluye la intervención temprana de los anticuerpos en la supresión de la infección destructiva de órganos inmunitarios que se necesita para la resistencia subsecuente.

#### ***21.4. Inmunidad mediada por células.***

Como los anticuerpos no constituyen un componente requerido para la resistencia inmunitaria contra la EM, puede suponerse que la IMC es importante. Esta conclusión la apoya la observación de que se necesiten células T funcionales para la resistencia así como la inmunidad vacunal.

Se han identificado pocos antígenos específicos implicados ya sea en la inmunidad humoral o en la mediada por células. En aves infectadas, los anticuerpos NV, probablemente se encuentren dirigidos contra la glucoproteína B (gB), y los anticuerpos monoespecíficos contra gB neutralizaron a los virus libres de células. Además, ya sea lagB sola o una vacuna recombinante de viruela aviar (VVA), o una vacuna de HVT expresando el gen gB de MDV protegieron contra el desafío por MDV. La glucoproteína A, expresada por un vector baculovirus, indujo anticuerpos en pollos, pero no se ha

informado de estudios de protección. El antígeno producido por el serotipo 1 del MDV parece proporcionar una protección más eficaz que la de los demás serotipos.

Una VVA recombinante, expresando la fosfoproteína pp38 no resultó protectora, aunque Pratt y colaboradores (1992) encontraron líneas celulares linfoblastoides expresando pp38, que resultaron blancos para la lisis restringida del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) mediante linfocitos T citotóxicos (LTC), inducida por los tres serotipos de MDV. El antígeno pp38 es de interés especial ya que se desarrolla tanto en células renales de pollo infectadas de manera productiva, como en líneas celulares no productivas a partir de células de MD. El enfoque utilizado por Pratt y colaboradores, es decir, la transfección de genes de WDV en líneas celulares a reticuloendoteliosis, que pueden servir como blancos singeneicos para LTC en una prueba de liberación de cromo (CRA, del inglés chromium-release assay) debe ayudar a identificar otros antígenos importantes en IMC. Otros estudios CRA, utilizan líneas celulares de MDV como blanco, pero estuvieron implicados aloantígenos y así las células efectoras no resultaron LTC.

La posibilidad de que estuviera implicado en la inmunidad un antígeno de superficie, encontrado en células transformadas por MDV, se originó por estudios en los que se demostró que los anticuerpos antiidiotipo contra MATSA, inmunizaban pollos contra el desafío con MDV virulento (Dandapat 1994).

### **21.5. Inmunidad por vacunas.**

Esta inmunidad es casi sin duda de naturaleza inmunitaria. No sólo el efecto protector de las vacunas inactivadas descarta la posibilidad alterna de interferencia viral, sino que la inmunidad por vacunas puede ser anulada por tratamientos inmunosupresores que afectan a la IMC, como el tratamiento con ciclofosfamida o mediante la infección con virus inmunosupresor de la anemia infecciosa aviar.

La eliminación de la inmunidad humoral por bursectomía y radiación X, no tiene efecto en la protección conferida por el MDV atenuado, aunque un tratamiento similar interfiere en parte con la inmunidad por vacuna de HVT. La inmunidad por vacunas de virus vivo incluyendo HVT, MDV atenuado y serotipo 2 de MDV parece estar dirigida en gran parte contra antígenos virales, pero posiblemente también contra antígenos tumorales. Todos protegen contra de la replicación temprana de virus virulentos en los órganos linfoides de las aves desafiadas, y reduce la intensidad de infección latente.

La evidencia que sugiere inmunidad antitumoral, proviene de informes de que las células, linfoblastoides pueden inducir inmunidad restringida a CMH en aves desafiadas con linfomas de MDV trasplantables y de que MDV, HVT y 8B-I atenuados pueden inmunizar contra tumores de MDV trasplantables incluyendo al trasplante JMV y a otros. En estos estudios, ninguna de las células trasplantables o de las líneas celulares utilizadas expresaron alguno de los antígenos relacionados con los virus usuales.

No obstante, la fosfoproteína pp38 podría explicar la actividad de algunas vacunas para inmunizar contra el desafío con células de tumor de EM trasplantable y, a la inversa, por la capacidad de células no productoras como JMV para inducir inmunidad contra el desafío con MDV.

Otros inmunógenos aún no descubiertos, también pueden ser compartidos por células tumorales y las células infectadas de manera productiva. Powell *et al* (1978), predijo la existencia de tales antígenos virales en las células transformadas.

#### **21.6. Otros mecanismos de resistencia.**

Los macrófagos pueden estar implicados en la resistencia mediante la restricción directa de la replicación viral, células B y los macrófagos inmunitarios pueden interactuar para inactivar a virus libre de células. La activación de los macrófagos mediante la inyección de caldo de tioglicolato en la cavidad peritoneal, redujo notablemente la incidencia de EM en las aves desafiadas. Parece que los macrófagos se encuentran además implicados en la inmunosupresión temprana transitoria después de la infección por MDV y, pueden inhibir la síntesis de DNA y la proliferación por líneas celulares linfoblastoides EM in vitro.

En EM, pueden ser importantes varias citocinas. Settnes (1982), revisó los efectos probables del interferón y observó que las concentraciones de esta citocina, como una respuesta temprana a la infección por MDV, pueden ser mayores en las aves resistentes, que en las susceptibles. El interferón protegió contra el tumor JMV transplantable, y parece que es una de las citocinas importantes para el desarrollo y conservación de la latencia con MDV.

También podría ser importante la resistencia innata en la forma de las células NK. Las células NK resultan citotóxicas para las células tumorales de EM y puede haber una relación entre estas células y la resistencia relacionada con la edad, y tal vez también sea genética. Luego de la vacunación con HVT o SB-I existe un aumento en la actividad de las células NK y las



concentraciones elevadas de células NK en tumores regresivos, pero no progresivos, podrían indicar una participación en la inmunidad intratumoral en la regresión de los tumores. De manera interesante, el sobrenadante de los cultivos de las líneas celulares linfoblastoides JMV-I, resulta protector cuando se utiliza como tratamiento previo al desafío con MDV, debido aparentemente en parte a la activación de linfocinas de las células NK (Keller 1992).

## **22. DIAGNÓSTICO.**

Durante los últimos 30 años, la E.M. se ha diagnosticado en base a los datos epidemiológicos, la sintomatología y la presencia de lesiones macro y microscópicas. Estos criterios siempre han tenido excepciones y ahora con frecuencia se empieza a comprender sus limitaciones.

Una característica de la E.M. era que se presentaba generalmente en aves menores de 16 semanas de edad, pero cada vez es más alarmante los focos que aparecen en aves adultas a partir del inicio de la puesta. Precisamente en estos casos de presentación en aves adultas, la parálisis de las extremidades debido a la infiltración linfocítica de los nervios periféricos ocurre en un número reducido de aves, predominando por el contrario la presencia de linfomas que pueden confundirse con los de la leucosis linfocítica. También, la E.M. en aves jóvenes se puede confundir con la reticuloendoteliosis por la similitud de los linfomas localizados en otros órganos distintos a la bolsa de Fabricio.

Por otra parte, las técnicas virológicas usuales para la detección de antígenos o virus o las serológicas para la comprobación de anticuerpos, no han encontrado una aplicación rutinaria en el diagnóstico diferencial de estas enfermedades debido a la amplia difusión de los tres virus ya citados

y a que en ellas no es infrecuente la infección con ausencia de tumores. En consecuencia la atención ha estado dirigida a la adecuación de métodos más sensibles y específicos para la realización del diagnóstico diferencial.

La técnica de PCR no podía por menos ser aplicada en el diagnóstico individual diferencial de las neoplasias transmisibles aviares. Como se ha comentado al tratar de la diferenciación de los serotipos, esta técnica de PCR se ha aplicado en el diagnóstico de la E.M.. Sin embargo, los inconvenientes derivados de su extrema sensibilidad que da lugar a falsos positivos y la negatividad que proporciona en pollos infectados pero sin desarrollo tumoral, limitan todavía su inclusión como método rutinario en el diagnóstico de esta enfermedad, aunque se abren unas expectativas favorables para su empleo en la comprobación y seguimiento de manadas negativas al virus de Marek.

También se ha prestado atención a la utilización en el diagnóstico diferencial de técnicas inmunocitoquímicas, empleando anticuerpos específicos frente a diversos marcadores celulares de superficie como MATSA o pp38, o diferenciadores de las poblaciones celulares T para la E.M. y la reticuloendoteliosis o B para la leucosis linfoide y también para la reticuloendoteliosis. Los resultados conseguidos son prometedores, pero requieren aún la validación en condiciones de campo. Igualmente a nivel experimental se han empleado sondas moleculares en el diagnóstico diferencial excluyente, con el fin de detectar inserciones clonales de los virus de la leucosis linfoide y reticuloendoteliosis, que requieren la verificación en el campo.

En realidad, el diagnóstico diferencial de las neoplasias aviares sigue siendo realizado en la mayoría de los laboratorios por el estudio microscópico de las lesiones y las características

citológicas de los tumores, lo que en ocasiones plantea dudas razonables ante la dificultad que a veces surge al establecer el dictamen citológico.

### 23. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.

Los linfomas son hallazgos comunes en pollos y gallinas comerciales infectados con el VEM, el virus de leucosis linfoide (VLL) y el de la reticuloendoteliosis (vRE) (Swayne 1996). El diagnóstico diferencial de estos linfomas se ha realizado con criterios basados en la patología y más recientemente en la virología y serología (Cuadro2). Sin embargo, los criterios serológicos y virológicos no tienen utilidad práctica, ya que la mayoría de los pollos y las gallinas están infectados y sólo algunos se enferman.

En circunstancias semejantes, las aves pueden ser positivas al aislamiento y a la detección de anticuerpos. Por tal motivo, la histopatología es el método de diagnóstico con más utilidad en la práctica en México, siempre y cuando se incluyan de rutina, nervios y bolsa de Fabricio, además se debe considerar la edad de las aves afectadas.

Sin embargo, debido a que la histopatología es una prueba subjetiva y en ocasiones no emite diagnósticos definitivos, se debe complementar con técnicas moleculares como inmunohistoquímica, *southern blotting* e hibridación molecular (Ewert 1997). Las pruebas inmunohistoquímicas se basan en que el VEM ataca LT, mientras que el VLL, a los LB, por lo que se utilizan anticuerpos monoclonales para marcar ambos tipos de linfocitos. Pero considerando que el VRE puede producir dos presentaciones, la bursal que ataca a los LB y la no bursal que infecta a los

LT, es necesario utilizar anticuerpos monoclonales contra los antígenos virales del VRE, el VLL y el VEM (Cuadro3).

**Cuadro 2**  
**CRITERIOS PATOLÓGICOS, VIROLÓGICOS Y SEROLÓGICOS UTILIZADOS PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LOS LINFOMAS VIRALES EN LA GALLINA**

<i>Criterios diagnósticos</i>	Enfermedad de Marek	<i>Reticuloendoteliosis bursal</i>	<i>Reticuloendoteliosis no bursal</i>	<i>Leucosis linfoide</i>
Neoplasia bursal	-	+ (-)	-	+ (-)
Células tumorales homogéneas	-	+ (-)	+ (-)	+
Infiltración linfoide neural	+ (-)	- (+)	+ (-)	-
Más de 14 semanas de edad para presentación	+ (-)	+	- (+)	+
Presencia del virus	±	±	±	±
Presencia de anticuerpos séricos	±	±	±	±

+ presente; - ausente; () ocasionalmente; puede estar ausente o presente  
Modificado de Calnek BW; Writter RL., 1997 y Biggs M., 1967.

**Cuadro 3**  
**REACCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLÓNICOS PARA MARCAR Y REALIZAR DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LOS LINFOMAS VIRALES EN LA GALLINA**

<i>Anticuerpos monoclonales</i>	Enfermedad de Marek	<i>Reticuloendoteliosis bursal</i>	<i>Reticuloendoteliosis no bursal</i>	<i>Leucosis linfoide</i>
Marcadores de linfocitos B	+	-	-	+
Marcadores de linfocitos T	+	-	+	-
VRE	-	+ (-)	+ (-)	-
VLL	-	-	-	+(-)
VEM	- (+)	-	-	-

+ positivo; - negativo; () ocasionalmente  
Modificado de Facyl AM., 1997.

Las técnicas de *southern blotting* e hibridación molecular que se basan en que el retrovirus de la leucosis linfoide (LL) y de la reticuloendoteliosis (RE), se insertan al ADN celular, a diferencia del VEM que no se incorpora al genoma celular. Según el punto de inserción de los retrovirus al ADN, se puede identificar el tipo de retrovirus utilizando las sondas específicas; en el Cuadro 4 se indican las sondas utilizadas para el diagnóstico diferencial de las infecciones aviares por retrovirus.

Otra enfermedad causante de tumores y cuya incidencia ha aumentado actualmente, es la leucosis mieloide (LM). La LM es producida por el retrovirus de la leucosis grupo J y los tumores que produce se originan en los centros hematopoyéticos de la médula ósea o extramedulares. El diagnóstico diferencial de estas neoplasias se realiza por medio de histología, diferenciando los componentes celulares involucrados. El componente celular de la LM son los granulocitos (principalmente heterófilos), o las células de la serie eritroide, componentes identificables por histología (Fadly 1992)

Otras enfermedades con lesiones macroscópicas similares son: carcinoma de ovario, tuberculosis, histomoniasis y ojo gris hereditario. Mientras que las enfermedades que tienen algunos signos clínicos similares a la EM son la enfermedad de Newcastle, perosis, discondroplasia, artritis e hiporiboflavinosis.

## 24. MONITOREO Y PROGRAMA

La toma de muestras para laboratorio será necesaria para la evaluación de la siguiente manera:

### 24.1. *Serología.*

Se recolectarán 25 sueros por muestreo, sin coágulos, lo menos hemolizados posible, perfectamente identificados. Dichas muestras se enviarán en refrigeración para su procesamiento.

### 24.2. *Necropsias.*

Se realizarán necropsias para la toma de fotografías con “close up” (acercamiento) y anotando la observación morfométrica de la relación bursa / bazo, la relación peso promedio del ave/peso de la bursa, así como de los hallazgos clínicos encontrados en los pollos examinados.

### 24.3 *Histopatología.*

Las muestras deben ser recolectadas de 5 aves elegidas al azar, cortadas en fragmentos de no más de 1 centímetro de grosor, colocándolas en solución de formalina al 10% **BUFFERADA** para enviar al laboratorio, sumergidas en una proporción equivalente a 10 veces el volumen de los tejidos.

Las muestras en formalina no deben ser sometidas a temperatura extremas (congelación o temperaturas mayores a 25°C), debiendo conservarse a temperatura de refrigeración (5–8°C) lo antes posible.

Los recipientes conteniendo las muestras serán identificados de la siguiente manera:

- Nombre de la empresa
- Nombre o número de plantel
- Galpón

- Edad
- Fecha de recolección de la muestra
- País de origen.

Edad (días)	Prueba	Muestra
1-3	ELISA, VSN - IBD	25 sueros
14	Histopatología	<i>Bursa, bazo, timo, hígado, proventrículo</i> 5 aves por galpón
21	Histopatología	<i>Bursa, bazo, timo, hígado, proventrículo</i> 5 aves por galpón
25	Histopatología	<i>Bursa, bazo, timo, hígado, proventrículo</i> 5 por galpón
28	Histopatología	<i>Bursa, bazo, timo, hígado, proventrículo</i> 5 por galpón
42-45 (Edad de procesamiento)	ELISA, VSN - IBD Histopatología	25 sueros <i>Bursa, bazo, timo, hígado, proventrículo, piel, nervio ciático, duodeno, páncreas, globo ocular,</i> 5 aves por galpón

**Cuadro 4.** Programa de Toma de Muestras

## 25. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO.

### ***25.1. Identificación del agente***

La infección de una población por MDV puede detectarse aislando el virus de tejidos de pollos infectados. Las fuentes más usadas son leucocitos de muestras de sangre con heparina o suspensiones de células de linfoma o de bazo. Se sugiere que, cuando estas muestras se toman en el campo, se transporten al laboratorio en condiciones refrigeradas. Como el MDV está muy asociado a células, es importante que estas suspensiones contengan células viables. Las suspensiones se inoculan en cultivos celulares en monocapa de células de riñón de pollo o fibroblastos de embrión de pato (los fibroblastos de embrión de pollo son menos sensibles para el aislamiento primario del virus). Los virus de serotipo 2 y 3 son más fáciles de aislar en fibroblastos de embrión de pollo que en células de riñón de pollo. Normalmente se inoculan 0,2 ml de una suspensión que contenga 10<sup>6</sup>–10<sup>7</sup> células vivas en monocapas duplicadas crecidas en placas de plástico para cultivo celular (de 60 mm de diámetro). Los cultivos inoculados y los no inoculados como control, se incuban a 38.5°C en un incubador con humedad que contenga 5% de CO<sub>2</sub>. Alternativamente, se pueden utilizar recipientes de cultivo cerrados. El medio se reemplaza cada dos días. Las áreas con efecto citopático, denominadas placas, aparecen a los 3–5 días y se pueden contar a los 7–10 días.

A efectos de diagnóstico, otra fuente menos común de MDV son los extremos de las plumas, de las que se puede extraer el MDV libre de células. Los extremos de 5 mm de largo, o trozos de piel cortados que contengan los extremos de las plumas, se suspenden en un tampón SPGA/EDTA (sacarosa, fosfato, glutamato y albúmina/ ácido etilén diamino tetra-acético) para la extracción y



titulación del MDV libre de células. El tampón se hace así: 0,2180 M de sacarosa (7.462 g), 0,0038 M de fosfato monopotásico (0,052 g), 0,0072 M de fosfato dipotásico (0,125 g); 0,0049 M de L-glutamato monosódico (0,083 g); 1% de albúmina bovina en polvo (1 g); 0,2% de EDTA (0,2 g); y agua destilada (100 ml). El tampón se esteriliza por filtración y debe tener un Ph aproximado de 6,5.

Esta solución se somete a ultrasonificación y se filtra por filtros de membrana de 0,45  $\mu$ m para inoculación en una monocapa de células de riñón de pollo desecada durante 24 horas. Después de una absorción de 45 minutos, se añade medio y el cultivo se incuba como antes durante 7–10 días.

Utilizando estos métodos, se pueden aislar los serotipos 1 y 2 de MDV, junto con el HVT (serotipo 3), si está presente a consecuencia de una vacunación. Con experiencia, se pueden diferenciar de modo muy ajustado las placas causadas por los diferentes serotipos de virus teniendo en cuenta el tiempo de aparición, la velocidad de desarrollo y la morfología de las placas. Las placas de HTV aparecen antes y son mayores que las de serotipo 1, mientras que las placas de serotipo 2 aparecen más tarde y son más pequeñas que las de serotipo 1.

Las placas causadas por el MDV y el HVT pueden identificarse como tales utilizando anticuerpos fluorescente específicos obtenidos en pollos. También se pueden utilizar anticuerpos monoclonales para diferenciar los serotipos.

### ***25.2. Reacción en cadena de la polimerasa.***

Se han secuenciado los genomas de los tres serotipos. Se han descrito pruebas mediante la reacción en cadena de la polimerasa que permiten distinguir algunas cepas oncogénicas y no oncogénicas de MDV de serotipo 1, y de cepas vacúnales de los serotipos. También se puede

utilizar la PCR para cuantificar la concentración de virus en los tejidos o para la detección diferencial de MDV y HVT en la sangre o en el extremo de las plumas.

## **26. PRUEBAS SEROLÓGICAS**

La presencia de anticuerpos contra el MDV en pollos no vacunados de unas dos semanas de edad constituye una indicación de infección. Antes de esa edad tales anticuerpos pueden representar una transmisión materna de anticuerpos a través de la yema vitelínica y no constituyen una prueba de infección activa.

Normalmente los virus, los antígenos y los antisueros están disponibles en los laboratorios de referencia de la OIE para la Enfermedad de Marek, pero aún no se han fabricado reactivos estandarizados internacionalmente.

### **26.1. Inmunodifusión en medio sólido**

No hay ninguna prueba prescrita para comercialización, pero para detectar anticuerpos normalmente se emplea la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IGDA). La prueba se hace en portas de vidrio que contienen agar al 1% en solución salina tamponada con fosfato que contiene 8% de cloruro sódico. Se llenan pocillos adyacentes con antígeno o suero y se incuban a 37°C durante 24 horas en un incubador con humedad para que tenga lugar la difusión; los sueros positivos muestran reacciones de identidad con muestras conocidas de suero positivo y antígeno. El antígeno usado en esta prueba consiste en células rotas de cultivos celulares infectados por el MDV o un extracto de extremos de plumas, o piel de animales infectados por MDV que contenga zonas plumosas. El antígeno del cultivo celular se prepara propagando el MDV en células de riñón de pollo

o fibroblastos de embrión de pollo. Cuando el efecto citopático muestra confluencia, las células se separan del recipiente del cultivo y se suspenden en medio de cultivo o en solución salina tamponada con fosfato sin caldo de triptosa fosfato (la presencia de caldo de triptosa fosfato puede producir líneas inespecíficas de precipitación a una concentración aproximada de  $1 \times 10^7$  células/ml).

Luego esta suspensión se congela y descongela tres veces y se usa como antígeno.

- Procedimiento de la prueba

I) Hacer una solución de Bactoagar de Difco al 1% en cloruro sódico al 8%, poniendo la mezcla al baño maría.

II) Pipetear 4 ml de la solución de agar sobre portas para microscopio de 7.5 cm x 2,5 cm y dejar reposar.

III) Cortar agujeros sobre al agar utilizando un molde y un agujereador de corcho No.1. El diámetro de los pocillos debe ser 5 mm., y los pocillos deben estar separados 2 mm. Eliminar los bloques de agar resultantes con un palito de algodón o una plumilla.

IV) Pipetear los sueros problema en los pocillos de las filas de abajo y de arriba, y suero estándar positivo y antígeno alternativamente en la fila central.

V) Incubar el porta 24 horas a 37°C en un recipiente con humedad y leer los resultados sobre una lámpara en una habitación a oscuras.

Se puede utilizar una variación de la prueba IGDA para detectar el antígeno MDV en extremos de plumas como una indicación de infección por MDV. Se preparan portas de vidrio con agarosa al 0.7% (por ejemplo, A37) en cloruro sódico al 8%, que contengan el antisuero contra MDV. Se toman los extremos de pequeñas plumas de los pájaros a examinar y se insertan verticalmente en el agar, manteniéndose los portas como se ha indicado antes. El desarrollo de zonas radiales de

precipitación alrededor de los extremos de las plumas denota la presencia de antígeno NDV en la pluma y, por lo tanto, la infección del ave.

### **26.2. Otras pruebas.**

Otras pruebas para detectar anticuerpos contra MDV son las pruebas de inmunofluorescencia directa e indirecta. Éstas demuestran la capacidad de un determinado antisuero para marcar las placas de MDV en cultivos celulares. Estas pruebas son específicas para cada grupo y más sensibles que la prueba IGDA. También se puede emplear una prueba de neutralización para ver la capacidad que tiene un suero para neutralizar la propiedad del MDV de formar placas. Sin embargo, esta prueba es más adecuada para propósitos de investigación que para el diagnóstico rutinario. Hay disponible un enzimoimmuno ensayo (ELISA) para detectar anticuerpos contra MDV. En la preparación de antígeno para la prueba ELISA, se recubren los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos con fibroblastos de embrión de pollo infectados por MDV. Se han publicado los detalles del procedimiento.

## **27. TRATAMIENTO**

No existe algún tratamiento práctico eficaz contra la EM, ni en parvadas ni en pollos individuales. Sin embargo, algunas aves que muestran signos clínicos de EM presentan regresión espontánea de sus lesiones y se recuperan bajo ciertas circunstancias.

## **28. PREVENCIÓN Y CONTROL.**

El desarrollo de vacunas que tienen éxito en el control de la EM, es un logro singular tanto en la agricultura (ya que antes de la vacunación, la EM se había convertido en la enfermedad de aves de mayor costo), como en la investigación básica de cáncer (ya que ésta fue la primera vez en que una enfermedad neoplásica importante se ha controlado de esa manera en cualquier especie).

La vacunación representa, hoy día y en el futuro previsible el tratamiento central para la prevención y control de la EM.

Sin embargo, la resistencia genética y la bioseguridad son importantes como adjuntos para la vacunación y pueden tener una importancia mayor ya que se están reconociendo de manera más amplia las limitaciones de la vacunación. Se encuentran disponibles estudios detallados.

### **28.1. Vacunas contra la enfermedad de Marek.**

Se han desarrollado varios tipos de vacunas a lo largo de estos años debido a la aparición de cepas más virulentas y la necesidad de controlarlas. Las vacunas producidas en la actualidad están elaboradas en base a serotipos atenuados del virus del Marek y serotipos no oncogénicos.

### 28.1.1.- ***Vacunas con el serotipo 1 atenuado***

Las cepas vacunales del serotipo 1 han sido atenuadas por pasajes seriados en cultivo celular. El número de pasajes depende de la virulencia inicial de la cepa, los días entre pasajes, el número de células transferidas y el tipo de cultivo celular (Witter., *et al* 1984). En la actualidad la cepa CVI988 es la más popular de este serotipo y la que se usa para vacunación, esta cepa fue aislada por Rispens y colaboradores (1972). La cepa CVI 988 o cepa Rispens tiene un bajo poder oncogénico y fue atenuada por 26-35 pasajes seriados en cultivo renal de embrión de pato y se usa para proteger a las aves contra virus de Marek altamente virulentos. A pesar de la efectividad de la cepa Rispens de gran uso en Europa, se han presentado algunos brotes en animales vacunados por lo que se sigue investigando para encontrar una cepa que induzca una mejor protección frente a un desafío por virus de mayor virulencia.

### 28.1.2 ***Vacunas con el serotipo 2***

Se aislaron cepas no patógenas de herpesvirus de aves clínicamente normales y se determinó que eran de un serotipo distinto por pruebas de inmunofluorescencia y por la prueba de precipitación en gel de agar. Las cepas del serotipo 2 son usadas para vacunas comerciales y la más conocida y la primera en ser utilizada es la cepa SB-1. Las vacunas elaboradas del Serotipo 2 tienen un bajo poder de protección, pero exhiben un sinergismo en protección cuando son usadas en combinación con el serotipo 3 en vacunas bivalentes. (Witter *et al.*, 1984).

### 28.1.3 **Vacunas con el serotipo 3**

A este serotipo pertenece el herpesvirus del pavo o HVT que es un virus no oncogénico y fue identificado en cultivos celulares de riñón de pavo o en cultivos inoculados con sangre de pavo (Witter, 1970). Las vacunas con HVT son las más ampliamente usadas en el mundo para prevenir la enfermedad de Marek, pero debido al aumento de la virulencia del virus de Marek, su uso está restringido a la vacunación de broilers, sin embargo se usa como componente de vacunas polivalentes en la vacunación de ponedoras y reproductoras (Witter, 2003).

### 28.2. **Vacunas polivalentes.**

Las combinaciones de cepas de SB1 (serotipo 2) y la cepa FC 126 (serotipo 3, HVT) proporciona una mejor protección contra la enfermedad de Marek que las vacunas administradas solas. Este fenómeno llamado sinergismo protector fue la base para el desarrollo de las vacunas bivalentes (Witter *et al.*, 1984). El sinergismo es específico al serotipo y se da en las combinaciones de serotipo 2 y 3. No se ha demostrado el sinergismo protector en combinaciones con el serotipo 1 (Witter *et al.*, 1997).

### 28.3. **Vacunas recombinantes.**

Ya se encuentran disponibles comercialmente vacunas recombinantes que tienen como vector al virus de la enfermedad de Marek, la mayoría de ellas son vacunas HVT que expresan genes de otras enfermedades tales como Gumboro y Newcastle (Heckert, 1996).

Las vacunas recombinantes desarrolladas específicamente contra la enfermedad de Marek están todavía en fase experimental e incluyen el uso del virus vivo de HVT que expresa genes del serotipo 1 (Lee 2003). Otras vacunas en desarrollo tratan de suprimir la expresión de los genes del

serotipo1 (Lee 2007) y otras investigaciones se han centrado en el estudio de los oncogenes meq, dado que la cepa muy virulenta MD5 carece del mismo y se quiere dilucidar su significado (Lupiani 2004; Lee *et al.*, 2007).

Las investigaciones más recientes incluyen la modificación de dominios dentro del oncogen meq en las cepas muy virulentas RB1B (Gimeno, 2008), pero a la fecha, ninguna de estas vacunas en desarrollo ha demostrado una eficacia mejor que la cepa CVI 988, esto demuestra que los genes involucrados en los mecanismos de infección y trasmisión de la enfermedad necesitan ser más estudiados para ser mejor comprendidos.

## 29 TIPOS DE VACUNAS

### 29.1. *Vacunas asociadas a células*

El virus de Marek es un virus altamente asociado a células, por lo que las vacunas son producidas en embrión de pollo, almacenadas en nitrógenos líquidos y administrados en suspensiones celulares. Las vacunas asociadas a células son muy lábiles y solo las células infectadas viables son capaces de transmitir el virus vacunal, por lo que el manejo durante el descongelado y la reconstitución se tornan de crucial importancia para que la vacuna conserve su eficacia. Los serotipo 1 y 2 solo están disponibles asociados a células.



### **29.2. Vacunas libres de células.**

Una característica del serotipo 3 HVT es que se puede obtener virus libre de células por sonicación de cultivos celulares infectados y se pueden producir vacunas liofilizadas de HVT libres de células, sin embargo la eficacia de las vacunas de HVT liofilizadas es menor a la eficacia de las vacunas asociadas a células debido a la interacción con los anticuerpos maternos. Se recomienda su uso solo en lugares donde no haya la logística para manejar células congeladas.

## **30. ADMINISTRACIÓN DE LA VACUNA DE MAREK**

### **30.1. Al nacimiento.**

La vacuna de Marek es administrada al nacimiento porque la inmunidad temprana es esencial para prevenir la enfermedad. Las vacunas asociadas a células y las vacunas liofilizadas son administradas por vía subcutánea o intramuscular a una dosis que no debe ser inferior a 2,000 unidades formadoras de placa (PFU) por pollito (Witter, *et al.*, 2003). Usualmente se administra entre 2,000 y 6,000 PFU. La revacunación es muy popular en Europa y trabajos recientes han demostrado que las aves revacunadas experimentan dos infecciones productivas consecutivas que hace que los linfocitos sanguíneos periféricos se vean más aumentados y haya mayores niveles de anticuerpos neutralizantes.



**Figura 21.** Vacunación al primer día de vida.

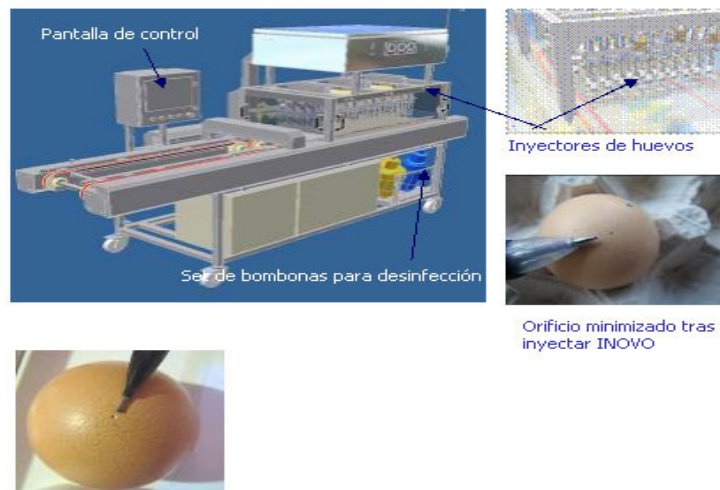
Por otro lado también se creía que el antígeno persiste, pero se demostró que en los animales con una sola vacunación la infección productiva es suprimida por anticuerpos maternos (Wu, 2009). Por otro lado se ha demostrado que la vacunación de reproductoras con el serotipo 1 ó 2 hace que la progenie responda mejor a la vacunación con HVT.

Para obtener un 100% de protección contra la enfermedad de Marek. Hay que considera los siguientes factores;

1. Método de producción de la vacuna
2. Aditivos a la vacuna
3. Errores de vacunación en la incubadora
4. Inmunidad materna
5. Factores genéticos del pollo
6. Exposición temprana a la enfermedad

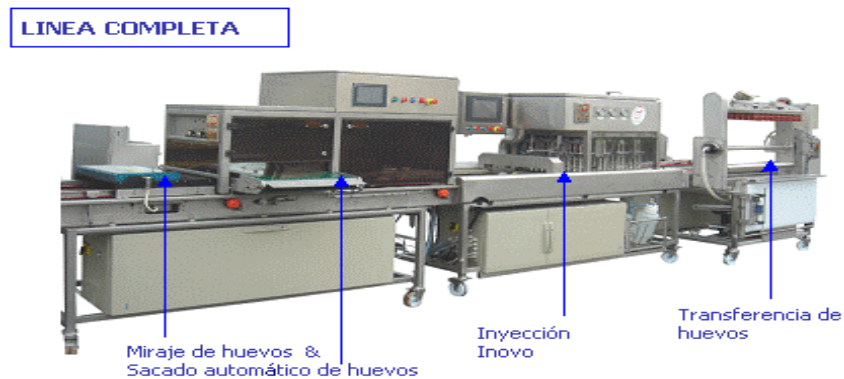
### 30.2. Vacunación *in ovo*.

La vacunación *in ovo* es relativamente un sistema nuevo para la aplicación de vacunas aviares, en el cual los embriones, en su último estado de incubación, son inyectados con ciertas vacunas de virus vivo. Los virus vacunales no afectan la incubabilidad, y los pollitos incubados y vacunados en el huevo demuestran evidencia de una inmunidad protectora. Este sistema es utilizado en más de treinta países del mundo.



**Figura 22.** Máquina de vacunación.

Una sola máquina computarizada, con inyectores múltiples, puede vacunar por encima de 30 mil huevos por hora. La vacuna con virus de Marek es administrada a los 18 días de desarrollo del embrión y se ha visto que las cepas del serotipo 3 (HVT) replican mejor *in ovo* que los virus de otros serotipos sin embargo la cepa CVI 988 ha demostrado igual protección al ser administrada al nacimiento o *in ovo*.



**Figura 23.** Maquina vacunadora de línea completa.

### **31. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO.**

Los productos biológicos comercializados para controlar la EM son virus vivos MVD o HVT respectivamente asociados a células o libres de células (liofilizados). Aunque se han desarrollado vacunas recombinantes por ingeniería genética, no están en uso comercial en la actualidad. Las vacunas contra la enfermedad de Marek se inyectan *in ovo* el día 17 o 18 de la embriogénesis o subcutáneamente después del nacimiento.

#### **31.1. Control del inóculo.**

##### **31.1.1. Características del inóculo.**

Los virus del grupo MDV se clasifican en tres serotipos –1, 2 y 3– por su relación antigénica.

- Serotipo 1: Éste incluye todas las cepas patógenas del virus, desde las cepas que son muy muy virulentas (por ejemplo, la 648A), hasta las muy virulentas (Md/5, Md/11, Ala-8, RB-1B), las virulentas (HPRS-16, JMGA), las de virulencia media (HPRS-B14, Conn A), y finalmente las débilmente virulentas (CU-2, CVI-988). Estas cepas se pueden atenuar por pases en cultivos celulares, perdiendo las propiedades patogénicas pero con retención de la

inmunogenicidad, originando cepas que se han usado como vacunas. Entre las usadas comercialmente se encuentran las cepas atenuadas HPRS-16 y CVI-988 (Rispens). Las variantes atenuadas de las cepas muy virulentas se han usado como vacunas experimentales para proteger contra la forma aguda de EM causada por las cepas muy virulentas, y la cepa vacunal R2/23 derivada de la Md/5 está autorizada en los Estados Unidos de América. Las vacunas contra el serotipo 1 se preparan en forma asociada a células (“mojadas”) y deben mantenerse en nitrógeno líquido.

- *Serotipo 2:* Éste incluye cepas naturales avirulentas de MDV (como por ejemplo, SB-1, HPRS-24, 301B/1, HN-1) y se ha visto que algunas de éstas confieren protección contra las cepas virulentas. Las cepas SB-1 y 301B/1 se utilizan comercialmente, en particular con HVT, en forma de vacunas bivalentes para protección contra las cepas muy virulentas. Las vacunas de serotipo 2 solo existen en forma asociada a células.
- *Serotipo 3:* Éste contiene las cepas de HVT naturales avirulentas (como la FC126, PB1) que se utilizan mucho como vacuna monovalente, y también en combinación con cepas de serotipo 1 y 2 como vacunas bivalentes o trivalentes contra las cepas muy virulentas de MDV. Se puede preparar HVT en forma libre de células como una vacuna liofilizada o bien en forma asociada a células (“mojada”).

### **31.2. Método de cultivo**

Los substratos usados para la producción comercial de vacuna son fundamentalmente fibroblastos primarios de embrión de pollo (CEF) derivados de aves libres del patógeno específico (SPF) o fibroblastos sobre de los patógenos transmitidos por el embrión de pollo y sobre los métodos de su detección.

### **31.3. Validación como vacuna**

Hay métodos disponibles para ensayar las aves SPF en cuanto a ausencia de infección (Morimura 1997) Los pollos de aves SPF deben estar libres de adenovirus aviares, incluyendo el virus 76 del síndrome de la puesta, del virus de la encefalomiелitis aviar, los virus de la leucosis aviar (subgrupos A, B y J), el virus de la nefritis aviar, los reovirus y rotavirus aviares, el virus de la anemia del pollo, el poxvirus de la gallina, el virus de la bronquitis infecciosa, el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa, el virus de la laringotraqueitis infecciosa, el virus de la gripe tipo A, MDV, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la reticuloendoteliosis, *Salmonella* spp, y virus de la rinoatraqueitis del pavo.

Las poblaciones de patos SPF deben carecer de adenovirus aviares, reovirus aviares, *Chlamydia*, virus de la enteritis del pato, virus tipo I y II de la hepatitis del pato, virus de la gripe tipo A, virus de la enfermedad de Newcastle, *Pasteurella* (ahora *Riemerella*) *anatipestifer*, virus de la reticuloendoteliosis, e infecciones por *Salmonella*. También puede ser necesario determinar la ausencia de otras infecciones a medida que se vayan reconociendo.

Para comprobar que el inóculo primario del virus no es patógeno para los pollos, se inocula diez veces la dosis de campo en pollos SPF de 1 día susceptibles a la EM, para asegurar que no

causa lesiones globales o microscópicas significativas debidas a la EM cuando tengan 120 días de edad. Debe advertirse que algunas cepas vacunales de MDV y HTV pueden producir lesiones nerviosas microscópicas leves y transitorias en estas circunstancias.

No debe ocurrir un aumento de la virulencia después de seis pases seriados de la cepa vacunal en pollos SPF de 1 día susceptible a la EM. Primero se inocula diez veces la dosis de campo y luego se hacen los pases inoculando sangre con heparina a intervalos de 5–7 días, y realizando pruebas de viremia para comprobar que el virus se transfiere en cada pase. Las aves que reciben el último pase se mantienen durante 120 días y deben carecer de lesiones de la EM. No obstante, algunas cepas como la de Rispens, pueden originar lesiones leves de EM. La cuestión clave es que la virulencia no debe variar. Ésta es una prueba difícil porque la resistencia genética de los pollos influye fundamentalmente en la virulencia aparente de los virus, y, por tanto, en el tipo de inóculo. Después de superar con éxito las pruebas de inocuidad de laboratorio, se debe confirmar la inocuidad de la cepa en numerosos ensayos de campo.

El virus de inóculo debe estar libre de los agentes señalados para poblaciones SPF y de otros contaminantes que se puedan adquirir en el laboratorio. Una cepa vacunal que derive de pavos debe carecer también del virus de la enfermedad linfoproliferativa y del virus de la enteritis hemorrágica. Se debe determinar la capacidad del virus del inóculo primario –y de los virus derivados después de los pases usados para producir el virus vacunal (por lo general, no más de cinco pases en cultivo de tejidos) – para proteger contra la EM. Se han publicado pruebas de protección estandarizadas. Implican la vacunación de pollos SPF de 1 día susceptibles a la EM y reinoculación de desafío 8 días después con suficiente MDV como para causar al menos un 70% de incidencia de EM en pollos no vacunados. Se utilizan dos tipos de prueba. En la prueba del índice de

protección, se vacuna con una sola dosis de campo (1000 PFU) (unidades formadoras de placas) y se compara la aparición de EM en aves vacunadas y no vacunadas. Los índices de protección deben ser superiores a 80, es decir, las aves vacunadas deben mostrar al menos un 80% de reducción en la aparición de EM en comparación con los controles no vacunados.

También se usa una prueba PD50 (dosis media de protección), que supone la inoculación de cinco diluciones seriadas de vacuna, a un cuarto cada dilución, elegidas para dar protección por encima y por debajo del 50%, y luego proceder a un inóculo de desafío 8 días después para determinar el valor PD50.

Los ensayos se realizan utilizando una vacuna estándar de referencia como comparación. La PD50 puede ser tan baja como 4 PFU, pero se pueden obtener valores superiores dependiendo de la cepa vacunal, de si libre de células o está asociada a células, y de la presencia o ausencia de anticuerpos maternos en los pollos de ensayo. Con los datos de la prueba PD50, se ha sugerido que la dosis mínima de vacuna en condiciones de campo debe ser superior a dos valores: 103 PFU, o, 100 PD50.

Se deben hacer numerosos ensayos de campo en presencia del virus natural de desafío, utilizando diferentes razas de aves con un estado variable en cuanto a anticuerpos maternos contra el MDV, para asegurar la eficacia y duración de la inmunidad. La experiencia indica que la inmunidad por vacunación, una vez adquirida, dura toda la vida.



## 32. MÉTODO DE FABRICACIÓN.

Las células usadas como substrato se siembran en recipientes de fondo liso para incubación estacionaria o en recipientes cilíndricos para incubación rotatoria. Los medios más usados son el medio mínimo de Eagle, o el medio 199, tamponado con bicarbonato sódico y suplementado con 5% de suero de ternero. La incubación se hace a 38–39°C durante 48 horas.

Para vacunas asociadas con células, los cultivos se infectan con stock del virus de siembra HVT o MDV para producción, en forma asociada a células, que por lo general tiene dos pases adicionales más que el stock primario de virus. Los cultivos se incuban 48 horas y luego se recogen las células tratando la monocapa celular lavada con una solución de EDTA/tripsina para favorecer que las células se despeguen. Los recipientes se devuelven al incubador (38.5°C) para permitir la liberación completa. Las células se someten a centrifugación a baja velocidad y después se resuspenden en una mezcla de congelación formada por medio de crecimiento con 7.5–15% de dimetil sulfóxido, y se mantienen a 4°C o se distribuyen de inmediato en los recipientes para la vacuna final, que suelen ser ampollas de vidrio, que se cierran a la llama y se congelan en nitrógeno líquido.

Las vacunas liofilizadas, sin células, se pueden preparar de cepas de HTV, pero no de cepas de MDV. Para la producción de esta forma de vacuna, los cultivos infectados por HTV se incuban 72 horas, las células infectadas se separan del recipiente como se indica arriba, o se raspan de las paredes del recipiente. Las células se suspenden en un volumen pequeño de medio de crecimiento, se centrifugan, y se resuspenden en una solución tamponada con estabilizador que contenga sacarosa al 8%, pero que esté libre de proteína para impedir la formación de espuma. La suspensión

se sonica para liberar el virus y los restos celulares se eliminan: luego, se diluye la suspensión con un estabilizador completo –como SPGA– añadido en los recipientes finales, y se liofiliza.

Las diluciones para las vacunas asociadas a células o para las libres de células se basan en la experiencia previa, como el número de dosis necesario por recipiente, ya que el contenido en virus del material recogido no se puede ensayar antes del llenado de los recipientes. La carga de virus del producto final se puede consignar luego en la etiqueta.

### **32.1. Control interno.**

Para tener óptimos resultados en la preparación de la vacuna asociada a células, es esencial una velocidad lenta de congelación (1–5°C por minuto) y una rápida descongelación. El título de infectividad de las células infectadas, y por tanto el número de dosis por ampolla, se determina después del llenado de las ampollas. De modo similar, el contenido en virus de la suspensión final de las vacunas liofilizadas, y por tanto el número de dosis por recipiente, se determinan tras el llenado.

### **32.2. Control de lotes**

#### **32.2.1. Identidad**

Utilizando un suero neutralizante monoespecífico, se debe comprobar que el producto es de la misma especificidad que el virus de inóculo. Esto se realiza mejor utilizando anticuerpos monoclonales.

### **32.2.2. Inocuidad y esterilidad**

Se requiere realizar muchas pruebas sobre los materiales utilizados para producir la vacuna y sobre el producto final. Las células de substrato deben proceder de una población de aves SPF que estén libres de agentes transmitidos verticalmente. Las sustancias de origen animal usadas en la preparación de vacunas, como el suero, tripsina y seroalbúmina bovina, deben carecer de agentes indeseables.

Los lotes de vacuna final producida deben probarse para ausencia de bacterias contaminantes, hongos, micoplasmas, y los virus indicados para poblaciones SPF; también deben realizarse pruebas de pureza de los diluyentes. Varias instituciones oficiales recomiendan pruebas adecuadas para la detección de agentes indeseables en todas las etapas de producción de vacunas.

Se debe inocular diez veces la dosis vacunal, o una cantidad de diluyente equivalente a dos veces la dosis vacunal, en pollos SPF de 1 día. No deberían ocurrir reacciones adversas durante un período de observación de 21 días.

### **32.2.3. Potencia**

La dosis estándar de cada tipo de vacuna es 1000 PFU por pollo o por huevo. Los ensayos sobre contenido vírico se realizan en lotes de vacuna para confirmar que se alcanzará la dosis correcta de vacuna por ave.

#### **32.2.4. Duración de la inmunidad**

Para la duración de la inmunidad sólo se realiza una prueba con el virus de inóculo. En apariencia, tal inmunidad es duradera para toda la vida.

#### **32.2.5. Estabilidad**

Las pruebas de estabilidad se hacen con seis lotes representativos de la vacuna para demostrar que se mantiene el título de virus durante la caducidad indicada para la vacuna. Estas pruebas deben realizarse bajo las condiciones de almacenamiento de la vacuna. El producto liofilizado debe tener una caducidad de 12 meses cuando se mantiene a 2–8°C. Los fabricantes pueden doblar el contenido de virus para compensar alguna pérdida en la titulación durante el almacenamiento. Se suministran líquidos adecuados para dilución con las vacunas asociadas a células y con las liofilizadas. Se debe probar la estabilidad de la vacuna reconstituida en un período superior a 2 horas.

#### **32.2.6. Conservantes**

No se incluyen conservantes en la vacuna o los diluyentes.

### **32.3. Precauciones (riesgos)**

Con las vacunas asociadas a células, es necesario evitar daños en las ampollas, que pueden explotar al retirarlas del nitrógeno líquido. Se debe utilizar protección ocular. Durante el uso, las vacunas reconstituidas se deben mantener en frío, y las asociadas a células deben agitarse para mantener las células en suspensión.

### **33. NORMAS DE ALMACENAMIENTO Y PREPARACIÓN DE LAS**

#### **VACUNAS CONGELADAS**

##### **33.1. Precauciones durante el almacenamiento.**

- Almacenar los viales de vacuna en nitrógeno líquido –a -196°C-, comprobando cada día que el nivel de nitrógeno líquido es satisfactorio. No es necesario que cubra las ampollas.

- Almacenar el diluyente entre +2°C y +25°C.

##### **33.2. Precauciones antes de empezar la reconstitución.**

- Utilizar material para inyectables, estéril que no contenga antisépticos –o desinfectantes-, para todo el procedimiento.

- En épocas frías, o si el diluyente se mantiene almacenado en refrigeración, dejar atemperar el diluyente hasta temperatura ambiente, antes de utilizarse para reconstituir la vacuna. Esto tiene por objeto que no haya una diferencia de temperatura demasiado grande entre la vacuna descongelada y el diluyente.

##### **33.3. Recomendaciones para la preparación de la suspensión vacunal.**

- Llevar guantes y gafas de seguridad durante las operaciones de descongelado y apertura de la ampolla.

- Retirar del contenedor de nitrógeno líquido únicamente las ampollas que se vayan a utilizar de forma inmediata.

- Descongelar rápidamente el contenido de la ampolla por agitación en un baño de agua a 27°C normalmente 1 minuto-. Bajar el contenido del cuello de la ampolla mediante suaves golpecitos con la uña. Abrir las ampollas cuando el último cubito de hielo se haya descongelado.

- Mantener los brazos estirados al abrir la ampolla para prevenir cualquier riesgo de lesiones, en caso de que la ampolla se rompa de forma violenta. Estadísticamente se ha comprobado que esto ocurre en menos de un 0,05% de los casos y se debe a que las ampollas se cierran con llama, y cuando el proceso de cerrado no es absolutamente perfecto, puede quedar un poro muy pequeño, causa de estas roturas.

- Inmediatamente después de la apertura, absorber el contenido de la ampolla de vacuna con una jeringa estéril de 5 ml equipada con una aguja de 18 G.

- Transferir la suspensión delicadamente sin presionar demasiado rápidamente el empujador de la jeringa- al envase del diluyente.

- Aspirar 2 ml del disolvente en la misma jeringa.

### **34. BIOSEGURIDAD.**

Debido a que en la EM carece de importancia la transmisión en embriones, el aislamiento durante la crianza y el saneamiento del ambiente constituyen un método primario de control que tiene éxito y que se utiliza ampliamente para las parvadas libres de patógeno específico. Por lo general, se requiere del uso de naves con aire filtrado y presión positiva. Mientras que no resultan prácticas como procedimiento primario de control, las prácticas estrictas de bioseguridad para limitar el grado de exposición temprana a MDV, resultan cruciales y eficaces para el costo como adjuntas a la vacunación. Desafortunadamente, el manejo actual de las aves coloca muy a menudo en cercana proximidad a una parvada con otra de reemplazo de diferentes edades, o requiere que se reutilice la camada de una parvada previa de pollo de engorda. Tal vez, la incapacidad para evitar una exposición temprana sea la causa sencilla más importante de los fracasos vacúnales. Con frecuencia, la mejoría en la higiene parece tener una participación principal y efectiva en el costo, en la eliminación de las pérdidas excesivas por EM en parvadas vacunadas. Se han revisado los principios sanitarios más importantes.

### **35. CONCLUSIÓN.**

Mucho más trabajo de investigación falta por hacer sobre el presente tema antes de se tengan todas las respuestas de cómo prevenir la enfermedad de Marek. Pero actualmente se conoce a ciencia cierta que es posible reducir las pérdidas por Marek haciendo lo siguiente:

Vacunar apropiadamente con una buena vacuna. Alojarse a los pollitos en instalaciones debidamente limpias y desinfectadas. Efectuar un buen manejo que evite el estrés.

### 36. BIBLIOGRAFÍA.

Benton, W. J., and Cover, M. S. The increased incidence of visceral Lymphomatosis in broiler and replacement birds. *Avian Dis.* 1: 320-327, 1957.

Biggs, P.M., H.G. Purchase, B.R. Bee, and P.J. Dalton. 1965. Preliminary report on acute Marek's disease (tüwl paralysis) in Great Britain. *Vet Rec* 77:1339-1340

Biggs PM. Marek's disease. *Vet Rec* 1967; 81:583-592.

Biggs, P.M., and L.N. Payne. 1967. Studies on Marek's disease. I. Experimental transmission. *J Natl Cancer Inst* 39:267-280.

Biggs, P.M., Jackson, C. A. W., Bells, R. A., Lancaster, F. M. and Milne B. S, A vaccination study with an attenuated Marek's disease virus. In: *Oncogenesis and herpesviruses*. Ed P.M. Biggs, G. de The and L. N. Payne. *Inst, Ag. Cancer Res. Lyon.* 139-146, 1972.

Bradley, G., M. Uayashi, G. Lancz, A. Tanaka, and M. Nonoyama. 1989. Structure of the Marek's disease virus BarnHI-H gene family: Genes of putative importance for tumor induction. *J Virol* 63:2534-2542.

Bülow, V.v., and P.M. Biggs. 1975. Differentiation between strains of Marek's disease virus and turkey herpesvirus by immunofluorescence assays. *Avian Pathol*4:133-146.

Bülow, V.v., and P.M. Biggs 1975. Precipitating antigens associated with Marek's disease viruses and a herpesvirus of turkeys. *Avian Pathol*4:147-162.

Calnek, 8.W., H.K. Adldinger, and O.E. Kahn. 1970. Feather follicle epithelium: A source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian Dis* 14:219-233

Calnek, 8. W. 1973. Influence of age exposure on the pathogenesis of Marek's disease. *J Natl Cancer Inst* 51:929-939

Calnek, 8. W., K.K. Murthy, and K.A. Schat. 1978. Establishment of Marek's disease lymphoblastoid cell lines from transplantable versus primary lymphomas. *Int J Cancer* 21:100-107

Calnek BW, Witter RL. Marek's disease. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM, editors. *Diseases of poultry*. 10th ed. Ames (Ia): Iowa State University Press, 1997:369-413.

Cho, B. R., Experimental dual infection of chickens with infectious bursal and Marek's disease agents. I preliminary observation on the effect of infectious bursal agent on Marek's disease. *Avian Dis.* 14: 665-475, 1970.



Churchill, A.E., R.C. Chubb, and W. Daxendale. 1969. The attenuation, with loss of oncogenicity of the herpes-type virus of Marek's disease (strain HPRS-16) on passage in cell culture. *J Gen Virol* 4:557-564.

Cole, R.K. Studies on genetic resistance to Marek's disease. *Avian Dis*, 12: 9-28, 1969.

Cruz, A., Mota, R., González. J., Schat, K.A. Importancia económica de la enfermedad de Marek en el Valle de México. *Veterinaria*. 4 en prensa, 1974

Dandapat, S., H.K. Pradhan, and G.C. Mohanty. .1994. Anti-idiotypic antibodies to Marek's disease-associated tumour surface antigen in protection against Marek's disease. *Vet Immunol Immunopathol* 40:353-366.

Edison, C. S., Schmittie, S.C., and Goode, R. B., and La, J.B. Induction of Leukosis tumors with the beetle *Alphitobius diaperinus*, *Am J. Vet. Res.*, 27: 1053-1057, 1966

Ewert DL, DuHadaway J. Molecular approaches for diagnosis of avian lymphomas. Proceedings of the Avian Tumor Viruses Symposium. 1997 July 21; Reno (Ne). Kennett Square (Pe): American Association of Avian Pathologists, 1997:12-18.

Fabricant, J., M. Ianconescu, and B.W. Calnek. 1977. Comparative effects of host and viral factors on early pathogenesis of Marek's disease. *Infect Immun* 16:136-144.

Fadly AM. An overview of subgroup J-like avian leucosis virus infection in broiler breeder flocks in the United States. Proceedings of the Avian Tumor Viruses Symposium. 1997 July 21; Reno (Ne). Kennett Square (Pe): American Association of Avian Pathologists, 1997:54-57.

Ficken MD, Nasisse MP, Boggan GD, Guy JS, Wages DP, Witter RL, *et al.* Marek's disease virus isolation with unusual tropism and virulence for ocular tissues: clinical findings, challenge studies and pathological features. *Avian Pathol* 1991;20:461-474.

Finkelstein, A., and R.F. Silva. 1989. Live recombinant vaccines for poultry. *Trends Biotechnol* 7:273-277.

Gentry, R. F. interference of Marek's disease immunity following simultaneous application of Marek's disease and fowlpox vaccines Abstracts AVMA Congress Denver, 136. 1974

Gimeno I M. 2008. Marek disease vaccines: A solution for today but a worry for tomorrow? *Vaccine* 26S: C31-C41

Gross, W. B. Effect, of social stress on occurrence of Marek's disease in chickens. *Am. J. Vet res*, 33:2275-1279, 1972.

Heckert RA, Riva J, Cook S, Mc Millen JK, Schwartz RD. 1996. Onset of protective immunity in chicks after vaccination with a recombinant herpesvirus of turkey vaccine expressing Newcastle disease virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase antigens. *Avian disease* 40: 770

Hlozaneck, I., O. Mach, and V. Jurajda. 1973. Cell-free preparations of Marek's disease virus from poultry dust (persisting infectivity/induction of tumours/temperature dependence/ sucrose-density gradient and electron-microscopic characteristics). *Folia Biol* 19:118-123

Holland, M.S., R.F. Silva, C.D. Mackenzie, R.W. Bull, and R. W. Witter. 1994. Identification and localization of glycoprotein B expression in lymphoid tissues of chickens infected with turkey herpesvirus. *Avian Dis* 38:446-453.

Hudson, L., and L.N. Payne. 1973. An analysis of the T and B cells of Marek's disease lymphomas of the chicken. *Nature (New Biol)* 241:52-53

Hughes, S.K., E. Stubblefield, K. Nazerian, and H.E. Varmus. 1980. DNA of a chicken herpesvirus is associated with at least two chromosomes in a chicken lymphoblastoid cell line. *Virology* 105:234-240

Hutt, F. B., and Cole, R.K. Genetic control of lymphomatosis in the fowl *Science*. 106-379-384. 1947.

Iaconesco, M. and Samberg. Y: Etiological and immunological studies in Marek's disease II. Incidence of Marek's disease precipitating antibodies in commercial flocks and in eggs. *Avian Dis*. 15: 177-186. 1971

Igarashi, T., M. Takagashi, J. Donovan, J. Jessip, M. Smith, K. Hirai, A. Tanaka, and M. Nonoyama. 1987.

Restriction enzyme map of herpesvirus of turkey DNA and its collinear relationship with Marek's disease virus DNA. *Virology* 157:351-358.

Ikuta, K., Y. Nishi, S. Kato, and K. Hirai. 1981. Immunoprecipitation of Marek's disease virus-specific polypeptides with chicken antibodies purified by affinity chromatography. *Virology* 114:277-281.

Jackson, C.A.W., P.M. Biggs, R.A. Bell, F.M. Lancaster, and B.S. Milne. 1976. The epizootiology of Marek's disease. 3. The inter-relationship of virus pathogenicity, antibody and the incidence of Marek's disease. *Avian Pathol* 5:105-123.

Jakowski, R. M., Frendrickson, T. N., Chomiak, T. W., Luginbulh, R. E., and Helmboldt, C F. Early changes in bursa of Fabricius from Marek's disease. *Avian. Dis*. 13:215-222, 1969.

Jones, D., L. Lee, J.L. Liu, U.J. Kung, and J.K. Tillotson. 1992. Marek's Disease virus encodes a basic-Leucine Zipper gene resembling the fos/jun oncogenes that is highly expressed in lymphoblastoid tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4042-4046.

Kato, S., and K. Hirai. 1985. Marek's disease virus. *Adv Virus Res* 30:225-277

- Kawamura, M., M. Hayashi, T. Furuichi, M. Nonoyama, E. Isogai, and S. Namioka. 1991. The inhibitory effects of oligonucleotides, complementary to Marek's Disease virus mRNA transcribed from the BamHI-H region, on the proliferation of transformed lymphoblastoid cells, MDCC-MSB I. *J Gen Virol* 72: 1105-1111.
- Keller, L.H., H.S. Lillehoj, and J.M. Solnosky. 1992. JMV- 1 stimulation of avian natural killer cell activity. *Avian Pathol* 21:239-250
- Kenzy, S.G., and P.M. Biggs. 1967. Excretion of the Marek's disease agent by infected chickens. *Vet Rec* 80:565-568.
- Lau, R. Y., and M. Nonoyama. 1980. Replication of the resident Marek's disease virus genome in synchronized nonproducer MKT -1 cells. *J Virol* 33:912-914.
- Lee, L.F., R.L. Armstrong, and K. Nazerian. 1972. Comparative studies of six avian herpesviruses. *Avian Dis* 16:799-805.
- Lee, L.F. 1996. Ribonucleotide reductase gene in Marek's disease. *Proc 5th Int Symp Marek's Dis* (in press).
- Lee LF, Witter RI, Reddy SM, Wu P, Yanagida N, Yoshida S. 2003. Protection and synergism by recombinant fowl pox vaccines expressing multiple genes from Marek's disease virus. *Avian disease* 47(3):549-58.
- Lee LF, Reddy SM, Kreager K. 2007. Recombinant Marek's disease virus lacking the oncogene Meq as a candidate for future control of Marek's disease in chickens. In: *Proceedings of the AMVA 2007*.
- Longenecker, R.M., F. Pazderka, J.S. Gavora, J.L. Spencer, and R.F. Ruth. 1976. Lymphoma induced by herpesvirus: Resistance associated with a major histocompatibility gene. *Immunogenetics* 3:401-407.
- Lupiani B, Lee LF, Cui X, Gimeno IM, Anderson A, Morgan RW. 2004. Marek's disease virus encoded Meq gene is involved in transformation of lymphocytes but is dispensable for replication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101(32):1815-20
- McColl, K., B.W. Calnek, W.V. Harris, K.A. Schat, and L.F. Lee. 1987. Expression of a putative tumor-associated antigen on normal versus Marek's disease virus-transformed lymphocytes. *J Natl Cancer Inst* 79:991-1000.
- Morimura T, Ohashi K, Sugimoto C, Onuma M. Pathogenesis of Marek's disease (MD) and possible mechanisms of immunity induced by MD vaccine. *J Vet Med Sci* 1997;60:1-8
- Nazerian, K., L.F. Lee, R.L. Witter, and D.R. Burmester. 1970. Ultrastructural studies of a herpesvirus of turkeys antigenically related to Marek's disease virus. *Virology* 43:442-452.

Nazerian, K., and J.M. Sharma. 1985. Pathogenesis of Marek's disease in turkeys. In B. W. Calnek and J. L. Spencer (eds.). Proc Int Symp Marek's Dis. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA, pp. 262-267.

Nicholls, T.J. 1984. Marek's disease in sixty week-old laying chickens. Aust Vet J 6 :243.

Oro, M., Y. Kawaguchi, K. Maeda, N. Kamiya, Y. Tohya, C. Kai, M. Niikura, and T. Mikami. 1994. Nucleotide sequence analysis of Marek's disease virus (MDV) serotype 2 homolog of MDV serotype 1 pp38, an antigen associated with transformed cells. Virology 201: 142-146.

Parker, M.A., and L.W. Schierman. 1983. Suppression of humoral immunity in chickens prevents transient paralysis caused by a herpesvirus. J Immunol 130:2000-2001.

Payne LN, Biggs PM. Studies on Marek's disease. II Pathogenesis. J Natl Cancer Inst 1967;39:281-302.

Pazderka, F., B.M. Longenecker, G.R.J. Law, U.A. Stone, W.E. Briles, and R.F. Ruth. 1974. Detection of identical B alleles in different strains of chickens: Association with resistance to Marek's disease. Anim Blood Groups Biochem Genet 5:18

Powell, P.C., L.N. Payne, J.A. Frazier, and M. Rennje. 1974. T lymphoblastoid cell lines from Marek's disease lymphomas. Nature 251 :79-80.

Powell, P.C. 1978. Protection against feline JMV Marek's disease- derived transplantable tumour by Marek's disease virus-specific antigens. Avian Pathol 7:305-309

Powell, P.C., and T.F. Davison. 1986. Induction of Marek's disease in vaccinated chickens by treatment with betamethasone or corticosterone. Isr J Vet Med 42:73-78.

Pratt, W.D., R.W. Morgan, and K.A. Schat. 1992. Characterization of reticuloendotheliosis virus-transformed avian T-lymphoblastoid cell lines infected with Marek's disease virus. J Virol 66:7239-7244

Purchase, H.G. 1985. Clinical disease and its economic impact. In L.N. Payne (ed.). Marek's Disease. Martinus Nijhoff: Boston, MA, pp. 17-24.

Rispens, B.H., van Vloten, J., and Baas, H. J. L. Same virological and serological observations on Marek's disease: a preliminary report. Br. Vet J. 125:445-463, 1969.

Ross, L.J.N. 1985. Molecular biology of the virus. In L.N. Payne (ed.). Marek's Disease. Martinus Nijhoff, Boston, MA, pp. 113-115

Ross, L.J.N., M. Sanderson, S.D. Scott, M.M. Binns, T. Doel, and B. Milne. 1989. Nucleotide sequence and characterization of the Marek's disease virus homolog of glycoprotein B of herpes simplex virus. J Gen Virol 70: 1789-1804.

- Ross, L.J.N., and M.M. Binns. 1991. Properties and evolutionary relationships of Marek's disease virus homologs of protein kinase, glycoprotein O and glycoprotein I of herpes simplex virus. *J Gen Virol* 72:939-947.
- Salomon, J. J., Witter, R.L., Stone, H, and champion, L. R. Evidence against transmission of Marek's disease virus. *Avian Dis.* 14:752-762, 1971.
- Settnes, O.P. 1982. Marek's disease-A common naturally herpesvirus-induced lymphoma of the chicken. *Nord Veterinaermed Suppl:II* 132.
- Schat, K.A., and B.W. Calnek. 1978. Characterization of an apparently nononcogenic Marek's disease virus. *J Natl Cancer Inst* 60: 1075-1082
- Schat, K.A., C.-L.H. Chen, W.R. Shek, and B.W. Calnek. 1982. Surface antigens on Marek's disease lymphoblastoid tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 69:715-720.
- Schat, KA. 1985. Characteristics of the virus. In L.N. Payne (ed.). *Marek's Disease*. Martinus Nijhoff, Boston, MA, pp. 77-112.
- Schat, K.A., B. W. Calnek, J. Fabricant, and D.L. Graham. 1985. Pathogenesis of infection with attenuated Marek's disease virus strains. *Avian Pathol* 14:127-146.
- Schat, K.A. 1987. Marek's disease: A model for protection against herpesvirus-induced tumours. *Cancer Surveys* 6: 1-37.
- Schat, K.A., C.-L.H. Chen, H. Lillehoj, B.W. Calnek, and D. Weinstock. 1989. Characterization of Marek's disease cell lines with monoclonal antibodies specific for cytotoxic and helper T cells. In S. Kato, T. Horiuchi, T. Mikami, and K. Hirai (eds.). *Advances in Marek's Disease Research*. Japanese Association on Marek's Disease, Osaka, Japan, pp. 220-226
- Schat, K.A., C.-L.H. Chen, B.W. Calnek, and D. Char. 1991. Transformation of T-lymphocyte subsets by Marek's disease herpesvirus. *J Virol* 65:1408-1413
- Sharma, J. M., Burger, D., and Kenzy, S. G. Serological relationship among herpesviruses. Cross reaction between Marek's disease herpesvirus. *Am. J, Vet. Res.* 32:291-301, 1971.
- Sharma, J.M., and B.R. Burmester. 1982. Resistance to Marek's disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with turkey herpesvirus. *Avian Dis* 26:134-149.
- Shek, W.R., B. W. Calnek, K.A. Schat, and C.-L.H. Chen. 1983. Characterization of Marek's disease virus-infected lymphocytes: Discrimination between cytolytically and latently infected cells. *J Natl Cancer Inst* 70:485-49
- Solana, Alfredo Dr. Significación patológica actual del virus de la enfermedad de Marek. 1996

Spencer, J.L., and B.W. Calnek. 1967. Storage of cells infected with Rous sarcoma virus or JM strain of avian lymphomatosis agent. *Avian Dis* 11 :274-287.

Spencer, J. L., grunder, A. A., Robertson, A., and Speckmann, G. W. Attenuated Marek's disease herpesvirus. *Am. J. Vet. Res.* 33:393-400, 1972.

Swayne DE. Nervous system. In: Ridell C, editor. *Avian histopathology*. 2nd ed. Kennett Square (Pe): American Association of Avian Pathologists, 1996:184-201

Theis, G.A. 1977. Effects of lymphocytes from Marek's disease-infected chicken on mitogen response of syngeneic normal chicken spleen cells. *J Immunol* 118:887-894.

Thornton, D.H. 1985. Quality control and standardization of vaccines. In L.N. Payne (ed.). *Marek's Disease*. Martinus Nijhoff, Boston, MA, pp. 267-291.

Venugopal, K., and L.N. Payne. 1995. Molecular pathogenesis of Marek's disease-Recent developments. *Avian Pathol* 24:597-609.

Vielitz, von E., and Landgraf, H. Beitrag zur Epidemiologie und Kontrolle der Marek'schen Krankheit. *Dtsche tierärztl, Wschr.* 77: 357-362, 1970.

Witter, R.L., J.J. Solomon, and G.H. Burgoyne. 1969. Cell culture techniques for primary isolation of Marek's disease-associated herpesvirus. *Avian Dis* 13:101-118

Witter, R.L., J.M. Sharma, and A.M. Fady. 1980. Pathogenicity of variant Marek's disease virus isolants in vaccinated and unvaccinated chickens. *Avian Dis* 24:210-

Witter, R.L. 1983. Characteristics of Marek's disease viruses isolated from vaccinated commercial chicken flocks: Association of viral pathotype with lymphoma frequency. *Avian Dis* 27:113-132.

Witter RL, Li D, Jones D, Lee LF, Kung HJ. 1997. Retroviral insertional mutagenesis of a Herpesvirus: A Marek's disease virus mutant attenuated for oncogenicity but not for immunosuppression or in vivo replication. *Avian disease* 41(2): 407-21.

Witter RL, Schat KA. 2003. Marek's disease. In: Sayf YM eds. *Diseases of Poultry*. 11th edition. Iowa State Press University. p 407-465.

Wu C, Gan J, Chen C, Liang P, Wu Y, Liu X, Ma L, Davison F. 2009. *Clin Vaccine Immunol*. Feb; 16(2): 184-93.

Yachida, S., T. Kondo, K. Hirai, H. Izawa, and T. Mikami. 1986. Establishment of a variant type of turkey herpesvirus which releases cell-free virus into tissue culture medium in large quantities. *Arch Virol* 91: 183-192