



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENCIA DEL GEN ICP4 DEL *Alphaherpesvirus* AVIAR EN *Gallus gallus* POR LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

BRISEIDA LUCÍA CASTRO BAUTISTA

TUTOR: Dr. Gary García Espinosa

COMITÉ TUTORAL: Dr. Elizabeth Loza Rubio

Dr. José Antonio Quintana López



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A CONACYT por la beca otorgada y al Departamento de Producción Animal: Aves por el financiamiento del proyecto y la oportunidad que me brindaron para la realización del presente trabajo.

Al comité tutorial por su constante orientación y apoyo para realizar dicho trabajo de investigación.

A mis padres Juan y Mica, a mis hermanos Moab, Cynthia, Omar y Nadia por su apoyo y ayuda para concluir este proyecto.

A mis compañeros de trabajo, amigos y a todos los que de manera directa o indirecta contribuyeron para realizar el presente trabajo de investigación.

LISTA DE CONTENIDOS

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
LISTA DE CONTENIDOS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
ABSTRACT	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN	13
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS PARTICULARES	14
HIPÓTESIS	14
MATERIAL Y MÉTODOS	14
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	22
LISTA DE ABREVIATURAS	23
LITERATURA CITADA	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resultados de la prueba de PCR estandarizada, en la que se muestra la amplificación del gen ICP4 del virus de la enfermedad de Marek, de una vacuna monovalente y de la vacuna del virus HVT con la cepa FC126.

Página 32

Cuadro 1. Análisis de secuenciación y comparación de la cepa CVI988 del virus de la EM con la base de datos de la secuencia de este virus, reportada en el genbank con el número de localización U17701.

Página 33

Tabla 1. Resultados del diagnóstico clínico patológico de cada caso sospechoso de la EM después de analizar la historia clínica y la realización de necropsias de aves que mostraron signos nerviosos.

Página 34

Tabla 2. Resultados de la prueba de PCR realizada en aves con presentación nerviosa sugestivo a la EM.

Página 35

Tabla 3. Resultados del diagnóstico clínico patológico de cada caso de aves sin signos nerviosos después de analizar la historia clínica y la realización de necropsias.

Página 36

Tabla 4. Resultado de la prueba de PCR realizada en aves sin presentación nerviosa.

Página 37

Figura 2. Gel de agarosa al 2% que muestra casos positivos de aves que presentaron problemas nerviosos.

Página 38

PRESENCE OF ICP4 GENE AVIAN *Alphaherpesvirus* FROM *Gallus gallus* THROUGH POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR).

Marek's disease is caused by an *alphaherpesvirus* that induce lymphoproliferative changes on several tissues and organs on poultry implicating immunosuppression, dead and economical losses. The objective of the present study was to detect the virus through a consensus Marek's disease virus gene called ICP4 which can be present on latent and productive virus replication. To achieve the goal we standardized a PCR utilizing a Marek's disease vaccine as ICP4 gene source. We used the chicken vaccine strain CVI988 and the FC126 from turkey vaccine as DNA source and the primers design were according to Handberg *et al* (2001). In order to identify the presence of Marek's disease virus on suspicious chicken, hens or game birds showing or not signs and lesions of Marek's disease, we collect and test by PCR the brain, nervous, lung, spleen, liver and pin primary feather. Our results shown that PCR technique were able to detect the virus on sciatic nerve and pin primary feather of birds showing nervous signs. This helped us to confirm that the virus is implicated on the sick bird. In the other hand the PCR test detected the virus on clinical healthy birds mainly on pin primary feathers.

Key words: *Alphaherpesvirus*, Marek's disease, CVI988, HVT, ICP4 gene, PCR.

PRESENCIA DEL GEN ICP4 DEL Alphaherpesvirus AVIAR EN *Gallus gallus* POR LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La enfermedad de Marek (EM) es provocada por un alphaherpesvirus que produce lesiones linfoproliferativas en distintos órganos y sistemas de las aves ocasionando inmunosupresión así como mortalidad y pérdidas económicas por decomiso de las aves. El objetivo del presente estudio fue detectar la presencia del gen ICP4 del virus de la EM siendo necesario estandarizar una prueba de PCR para la detección del gen ICP4 del virus de la EM, eligiendo al gen ICP4 por que es necesario para originar una infección productiva y se puede detectar cuando el virus esta en estado de latencia. Para estandarizar la prueba de PCR se utilizó como control positivo el virus vacunal de la EM cepa CVI988 y FC126 del herpesvirus del pavo (HVT), con los oligonucleótidos reportados por Handberg *et al* (2001). Los estudios se realizaron en 11 casos remitidos al departamento de producción animal: Aves de la FMVZ/UNAM, con signología nerviosa. Se realizó la prueba de PCR a partir de muestras de tejido de encéfalo, de nervio, de pulmón, de bazo, de hígado y del cálamus de las plumas primarias del ala. Los resultados indicaron que es posible detectar el gen ICP4 del virus de la EM y HVT con la prueba de PCR en aves con presentación nerviosa en muestras de nervio ciático y de las plumas, lo que sugiere que los signos nerviosos son causados por el virus de la EM; por el contrario sólo en un ave de combate adulta sin signos nerviosos se encontró el HVT en pluma lo que indica que el hospedador fue infectado por este virus y/o vacunado. También se observó que el cálamus de la pluma fue el sitio más recurrente para poder detectar el gen ICP4.

Palabras clave: Enfermedad de Marek, CVI988, HVT, gen ICP4, PCR.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Marek (EM) es causada por un *Alphaherpesvirus* que afecta a linfocitos T (LT) provocando inmunosupresión del ave, se caracteriza por provocar infiltración linfocitaria en varios órganos causando decomisos del ave en la planta de procesamiento y mortalidad en las aves de producción del género *Gallus gallus*, así como pérdidas económicas por una limitada producción de huevo para plato y carne. (Witter y Schat, 2003). La vacunación contra esta enfermedad en aves reproductores, de postura comercial y en pollo de engorda, es necesaria para reducir los efectos provocados por el virus de la EM.

El herpesvirus de la EM causa lesiones linfoproliferativas en las aves afectadas y es caracterizado por infiltrado mononuclear y desarrollo de linfomas. Los órganos afectados por el virus son principalmente los nervios periféricos, órganos viscerales y otros tejidos como el músculo, iris y piel (Mc Ferran y Nulty, 1993; Calnek y Witter, 1997; Calnek *et al*, 1989).

La EM es extensamente reconocida como un importante modelo en el estudio de enfermedades virales oncogénicas ya que el serotipo 1 del *Gallid herpesvirus 2* ha sido controlado desde comienzos de 1970 mediante la vacunación con virus no oncogénicos como el serotipo 2 y 3 pertenecientes al virus de la EM, disminuyéndose así las pérdidas económicas por mortalidad y decomisos en las aves (Baigent *et al*, 2005; Calnek, 1986).

Historia de la enfermedad

En 1907 la EM fue descrita por primera vez por el patólogo Húngaro József Marek, quien observó y describió las lesiones clásicas de la EM tales como: las afecciones paralíticas en alas y piernas, así como lesiones a nivel de columna vertebral y nervios periféricos en 4 gallos jóvenes, a la que denominó polineuritis (Payne, 1997; Biggs, 2001).

Payne (1997) menciona que en Estados Unidos el doctor Kaupp (1921) y en Holanda el doctor Van der Wale y Winkler Junius (1924), observaron una condición similar en el sistema nervioso central y periférico, llamándole parálisis de las aves o parálisis aviar (Payne, 1997; Biggs, 2001).

Entre las décadas de 1920 y 1930 se intentó replicar la enfermedad en otras aves pero no se tuvo éxito, sin embargo la parálisis de las aves ya se reportaba a nivel mundial (Payne, 1997)

Biggs (1961) clasifica la forma ocular, neural y visceral, con el término de EM, para distinguirla de la leucosis linfoide, adoptada por la Asociación Mundial de Veterinaria Aviar (Biggs, 1961).

Payne (1997) menciona que en 1967 Churchill, Biggs y colaboradores usaron el cultivo de células para el estudio de la enfermedad, reportando que el agente causal es un herpesvirus. Dos años más tarde aíslan la cepa virulenta HPRS-16 y la atenúan para el uso de vacunas (Payne, 1997).

El Dr. Bart Helmich Rispens y colaboradores en 1972 describen el uso de la vacuna atenuada cepa CVI988 y mientras tanto en Estados Unidos de América utilizan la vacuna del herpesvirus del pavo para controlar la EM. En 1977 aparece otra variante a la que denominan muy virulenta (vv) y dicha vacuna no fue suficiente para controlar la enfermedad, por lo que aplicaron la vacunación bivalente con una nueva cepa aislada SB-1 del serotipo 2 que combinaron con el serotipo 3 (HVT) del pavo y fue una vacuna eficiente para el control de la nueva presentación de la EM (vv plus) en 1990 (Payne, 1997).

De 1970 a la fecha aumentó el estudio de la EM conociendo su patogénesis y los factores que intervienen en la presentación de la enfermedad en las aves, así como estudios moleculares para la identificación y análisis de los genes que conforman al virus de la EM (Calnek, 1986).

Etiología

Estructura viral

El virus de la EM pertenecen a la familia *Herpesviridae*, sus principales características consisten en un virión de un diámetro de 120-200 nm, un cápside de un diámetro de 100 a 110 nm con una envoltura glicoproteica, es icosaédrico, con 162 capsómeras. El ADN es de doble cadena con 120-220 Kb que contiene un 35 a 75 % de G+C (Fenner, 1993).

Es clasificado como un *alphaherpesvirus* por su organización genómica, ya que esta organizado dentro de secciones denominadas único largo (U_L) y único corto (U_c), una repetición interna larga (IR_L) y una interna corta (IR_c) y con regiones repetidas terminal corta (TR_c) y larga (TR_L) en los cuales se encuentran los genes que codifican para las distintas proteínas del virus (Silva *et al*, 2001; Jang *et al*, 1997).

El genoma viral tiene la capacidad de codificar a más de setenta proteínas, de las cuales sesenta tienen homología con el herpesvirus simple (HSV), como en las proteínas estructurales, enzimas metabólicas y proteínas activadoras tal como la VP16 e ICP4 (Lupiani *et al*, 2001).

Durante la infección en cultivos celulares los genes virales pueden dividirse en tres tipos; los genes inmediatamente tempranos o alfa genes que son los que pueden transcribirse en ausencia de proteínas virales siendo estos los que inician la traducción de genes; los genes tempranos o beta genes es otro grupo que requiere de los genes inmediatamente tempranos para poderse transcribir y los genes tardíos o gamma genes se transcriben sólo después del inicio de la replicación del ADN viral (Peluca, 1985; Paterson, 1989).

El gen ICP4 se encuentra dentro de un conjunto de cinco genes tempranos que codifican polipéptidos de células infectadas siendo ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 y el ICP47; el gen ICP4 e ICP27 son esenciales para una infección productiva en cultivo celular (Pereira, 1977; Smith, 1986).

Al gen ICP4 lo integran oligonucleótidos que están asociados con la expresión de la latencia, localizados en la región interna corta y se sabe puede sobre regular su propio promotor así como para pp38 relacionado con las oncoproteínas y es llamado antígeno tumoral; pp24 y pp41, también interviene en el mecanismo de la transformación celular. El sitio autoregulador del gen ICP4 se encuentra localizado 525 pb dentro de la región codificante. (Morgan *et al*, 2001; Lupiani *et al*, 2001).

ICP4 es una grande y compleja molécula que tiene la habilidad de seleccionar y unir la secuencia consenso como ATCGTC del DNA y se necesita para activar la

expresión de los genes tempranos y tardíos. Se encuentra en el núcleo de las células infectadas en la replicación viral (Muller, 1987; Kattar-Cooley, 1989).

Clasificación del herpesvirus

Clasificación biológica

De acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus, los herpesvirus se dividen en tres subfamilias:

Alphaherpesvirinae integrados por

- Iltovirus
 - Gallid herpesvirus 1 (Iarigotraqueitis aviar)
 - No clasificado
- Mardivirus
 - Gallid herpesvirus 2 (Virus de la enfermedad de Marek tipo 1)
 - Gallid herpesvirus 3 (Virus de la enfermedad de Marek tipo 2)
 - Meleagrid herpesvirus 1 (Herpesvirus del pavo)
- Simplexvirus
- Varicellovirus
- Alphaherpesvirinae no clasificado

Betaherpesvirinae

Gammaherpesvirinae (virus linfoproliferativo)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=10292&lvl=3&p=mapview&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&keep=1&srchmode=1&unlock

1) Alphaherpesvirinae, son virus con un peso molecular de 80 a 110 x 10⁶ daltones, se caracterizan por ser altamente citopáticos y tener un ciclo corto de replicación, se esparcen rápidamente en los cultivos celulares y tienen la capacidad de establecer una infección primaria latente. De la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, el *Gallid herpesvirus 1* en las aves de corral, es responsable de la laringotraqueítis infecciosa aviar, enteritis viral del pato, enfermedad de Pacheco y herpesvirus de aves paseriformes como pinzones, pájaros tejedores, estorninos, canarios y cardenales; el *Gallid herpesvirus 2* y el *Gallid herpesvirus 3* son los responsables de provocar la EM, y el *Meleagrid herpesvirus 1* es el que afecta a pavos. El virus de la EM es un herpesvirus aviar que produce linfomas de

células T provocando la infección en pollos susceptibles. Estos linfomas se encuentran en distintas partes anatómicas del pollo como piel, órganos internos y músculo (Flint *et al*, 2000; Roizman, 1991; Mc Ferran y Nulty, 1993; Calnek y Witter, 1997; Swayne *et al*, 1998; Camp *et al*, 2003; Parcels *et al*, 2003; Günther *et al*, 1997; Tomaszewski *et al*, 2001; James *et al*, 2003; Hitchner y Calnek, 1980).

2) *Betaherpesvirinae*, afecta al ser humano y pertenece al herpesvirus 5 (genero de citomegalovirus), son virus que contienen de 13 a 15 kpb del DNA, biológicamente se caracterizan por tener un ciclo de replicación lento, formación de sincitios con la aparición de lisis celular varios días después de la infección. En su fase latente, el virus se localiza principalmente en tejido linfoide, glándulas secretoras y riñones (Michelson, 1999; Flint *et al*, 2000; Roizman, 1991).

3) *Gammaherpesvirinae*, son virus de un peso molecular de 1.2×10^8 daltones (Lee *et al*, 1971) con un diámetro de la cápside de 90 a 100 nm. El virus se caracteriza por producir una infección no lítica con persistencia, una fase lítica y una fase neoplásica; esta última da inicio a la formación de células linfoblásticas (Mc Ferran y Nulty, 1993).

Clasificación antigénica

Los herpesvirus se clasifican con base a su antigenicidad, ya que puede ser detectado en células infectadas *in vitro*, tal como las línea de células linfoblásticas e *in vivo* en el folículo de la pluma, la bolsa de Fabricio, timo, bazo entre otros (Mc Ferran y Nulty, 1993).

Se pueden diferenciar en 3 grupos

1. Cepas de alta y baja virulencia y sus variantes atenuadas
2. Cepas de la EM avirulentas y no oncogénicas
3. Cepas de HVT
4. Por la distribución viral en cultivos celulares (Mc Ferran y Nulty, 1993).

Clasificación serológica

El virus de la EM se divide en tres serotipos; el serotipo 1 (MDV-1) es el más virulento, que incluye cepas oncogénicas, así como la cepa avirulenta CVI988 que fue adaptada para ser utilizada en la vacunación de aves domésticas; el serotipo 2 (MDV-2), que se puede aislar de aves clínicamente sanas e incluye cepas apatógenas o de baja patogenicidad como la cepa SB1, es también utilizada en la vacunación de aves y se puede administrarse sola o en combinación con virus del serotipo 3. El serotipo 3 (MDV-3) es un herpesvirus avirulento que fue aislado del pavo (HVT) (Swayne *et al*, 1998; Handberg *et al*, 2001; Davidson *et al*, 2002).

Patogénesis

La replicación viral comienza cuando los receptores virales (gB, gC, gD) se unen a la membrana plasmática de la célula hospedera que contiene proteoglicanos, posteriormente se libera la nucleocápside en el citoplasma para ser transportada al núcleo de la célula y el ADN entra en el núcleo celular y se activa la transcripción de genes tempranos, posteriormente el RNAm es transportado al citoplasma para ser traducido.

Con ayuda de las γ proteínas el virión adquiere la cápside a partir del retículo endoplásmico, pero adquiere la envoltura lipídica en el aparato de Golgi, posteriormente sale al citoplasma y llega al espacio extracelular (Flint *et al*, 2000; Roizman, 1991; Mc Ferran y Nulty, 1993)

Infeción citolítica

El primer objetivo del *alphaherpesvirus* es provocar necrosis temprana a los linfocitos B (LB) y en pocos linfocitos T (LT). En las células del bazo se puede detectar la expresión del gen pp38 sobre todo en CD4⁺ y CD8⁺ durante cuatro a seis días posteriores a la inoculación. También son afectadas un gran número de células epiteliales. En esta fase hay producción de partículas virales incompletas. Ocurre necrosis en órganos como la bolsa de Fabricio y timo lo que provoca una inmunodepresión permanente a nivel humoral y celular (Calnek, 2001; Witter, 2003; Petrone *et al*, 2000).

Fase de latencia

El herpesvirus también se puede encontrar en su fase de latencia, en la cual se detecta el ADN viral, sin la producción de virus infeccioso, excepto en períodos de reactivación viral. En la fase latente las células blanco son principalmente los LT activados, especialmente los CD4⁺ y algunos LB localizados en órganos linfoides como el bazo, bolsa de Fabricio y timo. Se sugiere que estas células son las responsables de diseminar el virus al resto del organismo. A partir de este momento el virus infecta células no linfoides como son las células epiteliales del folículo plumoso, epidermis, proventrículo, riñón, páncreas y glándula adrenal. En la fase de latencia, el virus puede ser detectado en células satélite y células de Schwann no mielinizadas, en nervios periféricos (Calnek, 2001; Witter, 2003).

Fase de transformación

Los linfocitos T y B infectados con el virus pueden iniciar una transformación linfoblástica (Morgan, 2001; Cantello, 1997), que se caracteriza por la expresión de genes oncogénicos como el pp38, mientras que en la infección latente no existe la expresión de los genes oncogénicos (Calnek, 1997).

El herpesvirus de la EM causa lesiones linfoproliferativas en las aves afectadas y es caracterizado por infiltrado mononuclear y desarrollo de linfomas. Los órganos afectados por el virus son principalmente los nervios periféricos provocando lesiones linfoproliferativas, órganos viscerales y otros tejidos como el músculo, iris y piel (Mc Ferran y Nulty, 1993; Calnek, 2001, 1997; Calnek *et al*, 1989). Estos linfomas aparecen entre la tercera o cuarta semana posterior a la inoculación del virus, presentándose lesiones que constan de células linfoides pleomórficas, picnosis de las células linfoides, referidas como células de Marek que son derivadas de la expresión de líneas celulares linfoblásticas. (Moriguchi *et al*, 1986; Moriguchi *et al*, 1985).

Presentación clínica

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) menciona que la forma clásica de la EM está caracterizada por afecciones neurales, mortalidad que rara vez

excede de un 10 a 15% y puede ocurrir en pocas semanas o durante varios meses. En la presentación aguda se observan linfomas en órganos internos y puede aparecer entre el 10 a 70%, pero generalmente se observa una parcial o completa parálisis de piernas y alas. En la forma aguda presentan depresión y algunas pueden morir mostrando algunos signos característicos (Witter, 2003; Sharma, 1998).

Diagnóstico morfológico

A la necropsia se puede observar aumento de tamaño de los nervios periféricos como el braquial y ciático de dos a tres veces de lo normal, con pérdida de estriaciones y de color grisáceo o amarillento y en ocasiones edematoso. Los linfomas pueden ser pequeños, suaves y de color gris en ovario, pulmón, riñón, corazón, proventrículo, hígado y otros tejidos. El ojo gris es provocado por una iridociclititis y se puede presentar en aves de 16 a 18 semanas pudiendo presentar sólo este signo (Witter, 2003; Sharma, 1998).

Se pueden apreciar cinco presentaciones tumorales:

Presentación cutánea

No es común observarla en México, se caracteriza por aumento de tamaño en el folículo de la pluma, estas lesiones se observan con mayor frecuencia en la región crural externa y en el pterilo dorsal cervical observándose entre las ocho y nueve semanas de edad. En la presentación aguda, algunos linfomas aparecen en la piel alrededor de los folículos de la pluma y en músculo, las lesiones en la piel presentan aspecto inflamatorio o linfomatoso alrededor de los folículos infectados de las plumas, se observan agregados compactos de células proliferantes, células plasmáticas e histiocitos en la dermis, también se pueden encontrar cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos en los epitelocitos de la epidermis (Calnek, 1997; http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00103.htm).

Presentación visceral

Se observan tumores linfoides de aspecto nodular de color blanco marfil o blanco grisáceo bien delimitados en ovario, pulmón, corazón, mesenterio, riñón, hígado, bazo, adrenal, páncreas, proventrículo e intestino y se puede observar desde las 4

semanas de edad. La pared del proventrículo se engrosa y tiene una consistencia firme, pueden formarse nódulos, úlceras, hemorragias petequiales o equimóticas. En la bolsa de Fabricio se observa atrofia de folículos. Posiblemente se encuentre en México, pero no es común reportarla ya que se puede confundir con reticuloendoteliosis o leucosis linfoide (Petrone, 2000; Calnek, 1997; http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00103.htm).

Presentación muscular

Afecta a aves jóvenes y adultas presentando neoplasias linfoides difusas o nodulares en la superficie del músculo pectoral. Esta presentación es poco común en México (Petrone, 2000; Calnek, 1997; http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00103.htm).

Presentación ocular

Hay una iridociclitis observándose como ojo gris y distorsión pupilar la cual es debida a una infiltración de células tumorales en los nervios ópticos, en ojos se observa una infiltración mononuclear en el iris y en músculos oculares (recto lateral y los ciliares), material granuloso o amorfo en la cámara anterior, cornea, conjuntiva bulbar y el nervio óptico (Calnek, 1997).

Presentación neural

Dependiendo la cepa, se puede observar desde las seis semanas de vida y se diagnostica a partir del plexo celíaco, del mesentérico, del craneal, del braquial y del ciático. Los nervios afectados presentan pérdida de las estriaciones cambiando de color de perlado a gris amarillento y en ocasiones hay edema. Los nervios pueden engrosar dos o tres veces su tamaño normal y estas lesiones frecuentemente son unilaterales (Bankowski *et al*, 1969). En la presentación neural se observa incoordinación y parálisis de las alas y de las piernas de las aves domésticas, siendo ésta la presentación más común en México pero que se puede confundir con otras enfermedades que afectan el sistema nervioso central. Wither (1968) encontró que el sistema nervioso central de las aves afectadas era histológicamente normal concluyendo que la EM sólo afecta a nervios periféricos.

Diagnóstico histológico

La lesión histológica característica de la EM es la infiltración de linfocitos pleomórficos neoplásicos, células plasmáticas y macrófagos. Los linfocitos pleomórficos presentan un alto grado de anisocitosis y anisonucleosis. Se presentan células de Marek (células grandes con citoplasma basofílico vacuolado y núcleo vesicular, pleomórfico, basofílico oscuro con núcleo muy aparente), la infiltración monocítica se puede encontrar en los órganos afectados por las cinco presentaciones macroscópicas (Witter, 2003).

En los nervios periféricos existen dos tipos de lesiones principales; el neoplásico que consiste en un infiltrado de células linfoides pleomórficas, hay desmielinización y proliferación de las células de Schwann y el segundo que es la inflamación con infiltración difusa leve o moderada por pequeños linfocitos y células plasmáticas con edema, desmielinización y proliferación de las células de Schwann, así como algunos macrófagos (Calnek, 1989; Witter, 2003).

En glándulas proventriculares se puede observar necrosis y metaplasia columnar del epitelio con atrofia glandular e infiltrado de linfocitos pleomórficos, heterófilos y macrófagos, necrosis y posteriormente, atrofia del tejido linfoide de la bolsa de Fabricio, timo y bazo, éste último presenta hiperplasia severa de las células dendríticas (Calnek, 1989; Payne, 1967).

El virus también tiene la capacidad de provocar lesiones linfoproliferativas a nivel de la pulpa de la pluma; Muriguchi *et al* (1986) en un estudio que realizaron clasifican las lesiones de la pluma en severa, moderada, benigna y sin lesiones.

Prevención

LA EM puede controlarse con la vacunación, pero la utilización de virus vacunales ha favorecido la aparición de virus nuevos y más patógenos (Witter, 2001). Estas cepas son clasificadas como virulentas (v), muy virulentas (vv) y muy virulentas plus (vv+) (Schat *et al*, 1982; Witter, 1983, 1997). En los años 70's el antígeno HVT protegió contra la infección por el vMDV, pero no contra las cepas muy virulentas (Witter, 2001). Vacunas que tienen cepas del serotipo 2 o combinaciones con el serotipo 3, fueron usadas satisfactoriamente en los 80's

(Witter, 1982, 1997; Calnek *et al*, 1983; Witter, 1984), pero en pocos años, nuevas cepas muy virulentas plus como la 648A y 584^a desafiaron a las vacunas bivalentes provocando en las aves una parálisis e incremento en la mortalidad en las dos primeras semanas después de la entrada del virus (Witter, 1997; Gimeno *et al*, 1999). El surgimiento del vv+MDV-1 (cepa muy virulenta plus, del serotipo 2) tuvo lugar a la introducción de la vacuna CVI988/Rispens en EUA, misma que fue usado en Europa desde 1970 (Rispens *et al*, 1972; Witter *et al*, 1995; Suter, 1999). La mayoría de las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se hacen con la finalidad de detectar cepas o diferenciar entre los genes de cada cepas a partir de glicoproteínas (gB, gC, gD, gE, gH, gI, gL), fosfoproteínas (pp38) o el gen Meq. La prueba de PCR también es utilizada para determinar si las aves fueron vacunadas contra la EM y para el diagnóstico patológico del virus en aves domésticas (Shamblin, 2004; Karsten 2002; Bacon, 1993).

JUSTIFICACIÓN

En México, el diagnóstico de la EM se basa en la signología y la presencia de lesiones, neoplasias o polineuritis. Sin embargo, no en todas las ocasiones hay presencia de neoplasias, debido posiblemente a la presencia de variantes virales o por la inmunidad del ave a través de la vacunación, así también se pueden encontrar neoplasias de otra etiología como por retrovirus.

Es por ello que es necesario detectar la presencia de ADN viral en los tejidos del ave doméstica sospechosa (*Gallus gallus*), para lo cual es necesario implementar métodos rápidos y específicos, para la vigilancia de la incidencia y prevalencia de la enfermedad, así como la detección del surgimiento de cepas variantes del virus. La detección del virus se puede realizar en distintas muestras, tales como el cálamo de la pluma, órganos con cambios neoplásicos de las aves afectadas con la ayuda de pruebas moleculares como la PCR, ya que es una prueba simple, rápida, sensible y específica que ha ayudado en el diagnóstico e identificación de cepas virales de la EM en países como Estados Unidos, lo cual ha permitido el desarrollo de nuevas vacunas.

Por lo anterior en este trabajo se utilizó el gen ICP4 para detectar la presencia del virus de la EM en aves con signos y sin signos nerviosos, ya que el gen ICP4 conserva una secuencia de nucleótidos que se pueden identificar (Handberg *et al*, 2001; Davidson, 2001; Davison, 2002).

OBJETIVO GENERAL

Detectar la presencia del gen ICP4 del virus de la EM en aves vivas con presencia y ausencia de signos nerviosos de la especie *Gallus gallus*, mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

OBJETIVOS PARTICULARES

Estandarizar la prueba de PCR para la detección del *alphaherpesvirus aviar* a partir de cepas vacunales.

Determinar la presencia del virus de Marek a través del gen ICP4 del *alphaherpesvirus* aviar, a partir de órganos o tejidos de aves con presencia o ausencia de signos nerviosos, para confirmar el diagnóstico.

HIPÓTESIS

El virus de la EM se encuentra en aves del genero *Gallus gallus* infectadas con signología y sin signología nerviosa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras: Se analizaron tejidos de encéfalo, de nervio, de pulmón, de bazo, de hígado y del cálamo de la pluma de 41 aves pertenecientes a 11 casos de aves con signología nerviosa y 24 aves de 6 casos sin signología nerviosa remitidas a la sección de diagnóstico al Departamento de Producción Animal: Aves de la FMVZ, de la UNAM.

Vacunas: Se utilizaron vacunas comerciales para estandarizar la prueba de reacción en cadena de la polimerasa de la cepa vacunal atenuada CVI988 del serotipo 1 (patógena) y de la cepa FC126 del serotipo 3 (apatógeno) del herpesvirus del pavo (HVT).

Iniciadores: Para la realización de la prueba de PCR, se utilizaron 100 pmol de cada oligonucleótido reportados por Handberg *et al* (2001), que amplifican la región del gen ICP4 del virus de Marek y del virus HVT, publicados en el genbank, con el numero U17701 y 68653 respectivamente.

Serotipo 1 CVI988

F-MDV-1.1 5'GGA TCG CCC ACC ACG ATT ACT ACC3'

R-MDV-1,8 5'ACT GCC TCA CAC AAC CTC ATC TCC3'

La longitud del fragmento amplificado por la PCR es de 247pb.

Serotipo 3 FC126

HVT-1 5'ATG GAA GTA GAT GTT GAG TCT TCG3'

HVT-2 5'CGA TAT ACA CGC ATT GCC ATA CAC3'

La longitud del fragmento amplificado por la PCR es de 505 pb.

El gen ICP4 está descrito en el genbank entre las 717-740 pb y las 941-964 pb del U17701 ICP4 del VEM.

Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Extracción del ADN por solución de lisis en pulmón, en hígado y en bazo.

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo por el método de fenol cloroformo, principalmente en órganos parenquimatosos como el hígado y el bazo. Estos órganos se maceraron con PBS estéril, a una proporción 2:10; posteriormente fueron centrifugados (centrífuga Sorvall®) a 1,500 rpm por 10 minutos, se tomaron 250 µl del sobrenadante y se incubaron en baño de María (Pharmacia Biotech®) toda la noche a 37° C con 250 µl de 0.001M de EDTA – 0.01M de Tris- HCl, pH 8.0 (amortiguador TE) con duodecil sulfato de sodio (SDS al 1%) y proteinasa K (1mg/ml).

Posteriormente se llevó a cabo la extracción con fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y cloroformo-alcohol-isoamílico (24:1).

El ADN se precipitó con etanol frío y una vez concentrado fue resuspendido en 100 µl de agua dietilpirocarbonato (DEPC) y se conservó a –20 ° C hasta su utilización (Sharma, 1998).

Extracción alcalina del ADN celular utilizada en pluma, en encéfalo y en nervio.

La extracción del ADN por el método de extracción alcalina descrito por Malagró *et al* (2002), se realizó a partir del cálamus de la pluma y del encéfalo y nervio. El procedimiento para el cálamus de la pluma consiste en colocar aproximadamente cinco mm³ de la muestra en un tubo Eppendorf y agregar 20 µl de hidróxido de sodio (NaOH) a 0.2 M; posteriormente se coloca en baño de María (Techne Tempette®) a 65°C por 10 a 15 minutos. Una vez concluida la incubación con NaOH se agregan 180 µl de Tris HCL (ácido clorhídrico), con un pH de 7.5 y posteriormente se realizó la PCR con 5 µl de la muestra.

PCR .

Se prepara una mezcla para PCR de 50 µl que contiene 5 µl del ADN purificado,

100 pmol de cada iniciador, 0.5 U Taq, 1X buffer polimerasa, 1mM MgCl₂, 2mM de deoxinucleótido trifosfato (dNTP's), agua DEPC cbp la reacción de PCR a 50 µl.

En el termociclador (Termo Hybaid PCR Express®) se programaron 28 ciclos con 2 pasos, el primer paso a 94°C por 30 segundos, 55°C por 90 segundos y 72°C por 60 segundos; el segundo paso de 72°C por 5 minutos y se bajó la temperatura a 4°C hasta la electroforesis.

Posteriormente, los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, a 100 voltios, por 1 hora, en una cámara de electroforesis (Horizon 58 Life Technologies®). Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb (Fermentas®). Las bandas de ADN fueron teñidas con bromuro de etidio (1 µg/ml de bromuro de etidio) y visualizadas en un transiluminador UV (UVP®).

Purificación del ADN vacunal para la secuenciación

Ésta se realizó como lo menciona el protocolo de “Concert gel extraction systems” (Gibco BRL®), para geles de agarosa al 2%, y consistió en cortar y extraer el fragmento del gen que se visualizó en el gel de agarosa, para pesarlo y colocarlo en un tubo de polipropileno, ahí se lavó con una serie de amortiguadores que eliminaron el agarosa y dejaron expuesto el ADN que se secuenciaría; finalmente se lavó con etanol para remover los residuos del amortiguador de lavado y así se obtuvo el eluido del ADN que se procesó para su secuenciación.

Secuenciación del ADN vacunal cepa CVI988

Para la secuenciación se enviaron las muestras al laboratorio de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

RESULTADOS

Al estandarizar la prueba de PCR para el virus vacunal CVI988 se observó que el peso molecular no coincidía con el descrito por Handberg *et al* (2001) por tal motivo se decidió conocer la secuencia de bases que se amplificaron con la prueba de PCR.

La secuenciación del virus vacunal CVI988 mostró que se trataba de un fragmento de 288 pb misma que corresponde a la secuencia de bases publicada por McKie *et al* (1995), para confirmar que la secuencia encontrada del virus vacunal corresponde a la publicada en el genbank, localizada con el número U17701 que corresponde al gen ICP4, se comparó y alineó con el programa **Workbech**. Los resultados se muestran en el Cuadro 1.

Una vez estandarizada la prueba de PCR en la que se amplifica el gen ICP4 del virus CVI988 y del virus FC126 (Figura 1), se procesaron las muestras de 17 casos de aves que fueron remitidas al Departamento de Diagnóstico de la FMVZ-UNAM de junio de 2003 a junio de 2005, analizándose 11 casos de aves que mostraron signos nerviosos y 6 casos de aves que no los presentaban (Tablas 1, 2, 3 y 4).

De un total de 17 casos remitidos al Departamento de Producción Animal: Aves de los cuales once casos, que lo constituyeron 41 aves, presentaron signos nerviosos, sospechosos de la EM, las aves que se monitorearon fueron de combate, reproductores y aves de postura. Seis casos restantes, que integraron 24 aves sin signos nerviosos, en su mayoría de combate, se monitorearon con la finalidad de saber si se detectaba en las aves el virus de la EM.

Se encontró que en seis de once casos de aves que mostraron signos nerviosos fueron positivos a la EM por el diagnóstico patológico, se detectó en 7 de las aves el gen ICP4 con la prueba de PCR del VEM siendo tres positivas a la cepa CVI988, una a HVT y una ave a ambos virus (CVI988 y HVT).

En las aves con signos nerviosos hubo un caso en el que no se pudo llegar a ningún diagnóstico patológico pero al analizar las muestras con la prueba de PCR fue posible determinar que se encontraba positivo al virus CVI988.

Remitieron dos casos de reproductores pesados que mostraron problemas de claudicación, informando en el diagnóstico clínico patológico la presencia de *Mycoplasma synoviae* y al proceder con el diagnóstico por PCR para la EM se observó que no se amplificó el virus de la EM y el virus HVT.

Cinco de los once casos de aves que mostraron problemas nerviosos, que fueron compatibles con la EM en el diagnóstico clínico patológico, también dieron resultados positivos a la prueba de PCR, detectando el virus en su mayoría en el cálamus de la pluma, seguido del nervio y en un solo caso se encontró en pulmón.

Es importante mencionar que no siempre se encuentra el virus en los diferentes órganos blanco, tales como el bazo e hígado, pero en el presente trabajo generalmente se ha podido detectar el virus en pluma siendo éste el sitio de diseminación viral.

De los seis casos de aves sin signos nerviosos que se monitorearon, sólo en un caso pudo ser detectado el virus del HVT por PCR a partir de pluma.

DISCUSIÓN

En México, el diagnóstico de la EM se hace a partir del análisis de la historia clínica como de las observaciones al examen clínico y a la necropsia e histopatología, a partir de las aves con problemas nerviosos o con presencia de neoplasias. Desafortunadamente no siempre se puede llegar al resultado definitivo por falta de resultados contundentes, ya que algunas aves no presentan alteraciones nerviosas provocadas por el virus de la EM, neoplasias o las neoplasias que presentan son causadas por otro agente etiológico. Esto posiblemente por la presencia de variantes del virus, por la inmunidad que genera el ave a través de la vacunación o por causa de otros agentes infecciosos o patologías.

La estandarización de la prueba de PCR del gen ICP4 del virus de la EM, nos permitió determinar la presencia del virus, la incidencia de la enfermedad y la dinámica del virus en ciertas aves del género *Gallus gallus*, así como a confirmar el diagnóstico de la EM.

Es conocido que las cepas vacunales CVI988 y FC126 han sido detectados por PCR en la pluma y distintos órganos y tejidos, tales como el hígado, el bazo, el riñón, el ovario, el testículo y el nervio periférico, incluidos los órganos linfoides, desde los catorce días hasta los cincuenta y seis días posteriores a la vacunación y entre los tres y los siete días posteriores a la vacunación en las células linfocitarias sanguíneas (Endoh *et al*, 1996; Handberg, 2001). Lo anterior significa que el virus puede ser detectado por PCR en un periodo largo después de que ha infectado al hospedador. La detección del virus bajo condiciones de campo y no experimentales pone de manifiesto en este estudio, que los signos nerviosos fueron causados por el virus de la EM en siete de las cuarenta y un aves con una presentación nerviosa y no neoplásica, como por ejemplo en el caso número 4 de las aves que mostraron flacidez del cuello y alas con ausencia de lesiones compatibles con la EM, la prueba de PCR de los tejidos detectaron la presencia del virus dándole así un apoyo valioso al diagnóstico.

En el caso de aves de combate con signos nerviosos donde no se tienen antecedentes de vacunación, la detección del virus de Marek (fragmento de 288 pb) en pluma apoya al diagnóstico y permite la discusión sobre el desarrollo de la enfermedad y su epizootiología.

En el caso de las gallinas de postura que presentaron afecciones nerviosas, la detección del virus de Marek o HVT (fragmento 288 y 505 pb respectivamente) en pluma, en nervio y en pulmón, que fueron vacunadas al día de edad, sugiere que la vacuna no protegió a las aves ante un desafío viral, o que se encontró el gen vacunal, como en el caso 10 en el que las aves de postura fueron vacunadas con las cepas HVT y SB1.

La detección del gen HVT a partir de pluma y proveniente de aves sin signos nerviosos indica que el virus vacunal se estaría diseminando en el ambiente con algún impacto para otras especies como los pavos en los que sabemos que el virus es patógeno. Debido a que no se encontró en otros órganos, es probable que la infección se haya dado alrededor de los 50 días, ya que de acuerdo con Yunis *et al* (2004) y Baigent *et al* (2005), sólo se puede detectar (por PCR) el virus en órganos en los primeros catorce días posteriores a la infección y en el cálamo de la pluma alrededor de los diez días posteriores a la vacunación (Baigent, 2006).

Con respecto al resultado clínico y/o patológico, se pudo observar que en cinco casos de aves con signos nerviosos, donde se diagnosticó positivo a la EM, pudo corroborarse el diagnóstico con la prueba de PCR, por lo que una vez más la prueba de PCR ayudó a confirmar la presencia del virus.

En el presente estudio se encontró evidencia del virus de la EM, pero no fue posible diferenciar el virus vacunal de el virus de campo o determinar el genotipo del virus ya que para ello es necesario diseñar iniciadores para las distintas cepas como son HPRS 16 *att*, MD5, GA, RB-1B, MD11 (Handberg *et al*; 2001) por mencionar algunas de las reportadas en la literatura. Estos virus podrían estar presentes en México, por lo que sería importante hacer una prueba tamiz para identificar que subtipo es el prevalente en aves del género *Gallus gallus*.

CONCLUSIONES

Con los resultados del presente trabajo no fue posible determinar si el gen ICP4 proviene de la vacuna, del virus de campo o de ambos, ya que la prueba estandarizada no es capaz de diferenciar entre cepas virales. Sin embargo, es importante mencionar que en la mayoría de los estudios realizados (Handberg, 2001) se detecta el virus de la EM hasta los cincuenta y seis días posteriores al desafío viral en el cálamus de la pluma siendo este el lugar ideal para realizar la prueba de PCR.

Es de mucha ayuda realizar el diagnóstico de la EM con la prueba de PCR a partir de la pluma, ya que ayuda a monitorear la enfermedad y sobre todo saber si la vacuna aplicada está protegiendo a las aves vacunadas al detectar el gen ICP4, por otra parte, el cálamus de la pluma es una muestra de fácil obtención al no requerir el sacrificio de las aves a monitorear, y el manejo que se realiza al cálamus de la pluma para realizar la extracción de ADN es económico, sencillo, práctico y rápido, ya que de acuerdo a Baigent *et al* (2006), el virus se puede detectar en el cálamus de la pluma al décimo día posterior a la vacunación.

Para futuros estudios es necesario estandarizar una prueba de PCR para la diferenciación entre las cepas del *Gallid herpesvirus 2 y 3* y el *Meleagrid herpesvirus 1* causantes de la EM, ya que ayudaría a la industria avícola a conocer si los padecimientos de las aves de granja, o de combate, están asociados al virus de la EM o a otro virus distinto.

Perspectivas

Es conveniente realizar un monitoreo viral en aves de granjas, con la ayuda de la técnica de PCR y conocer en qué momento posinfección se puede detectar el virus tanto vacunal como de campo, ya que nos ayudaría a conocer la distribución, dinámica y patogenicidad del virus y propiciaría el mejoramiento de la sanidad integral que se aplica en las granjas, ayudando así a incrementar la salud y productividad de las explotaciones de las aves de corral.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGID	Inmunodifusión en gel de agar
CVI988	Cepa del serotipo 2 de la EM (apatógeno)
DEPC	Dietilpirocarbonato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EM	Enfermedad de Marek
FC126	Cepa del serotipo 3 (vacunal de pavo)
F-MDV	“Forward Marek’s disease virus”
G+C	Guanina más citosina
HCL	Ácido clorhídrico
HSV	Herpesvirus simple
HVT	Herpesvirus del pavo
IR_C	Repetición interna corta
IR_L	Repetición interna larga
Kb	Kilobase
Kpb	Kilopares de bases
LB	Linfocitos B
LT	Linfocitos T
MDV	“Marek’s disease virus”
ml	Mililitros
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PBS	Solución buferada de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
R-MDV	“Reverse Marek’s disease virus”
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Duodecil sulfato de sodio
TR_C	Repetida terminal corta
TR_L	Repetida terminal larga
U_C	Único corto
U_L	Único largo
μl	Microlitros
UV	Ultravioleta
μg	Microgramos
VEM	Virus de la enfermedad de Marek
vMDV	Virus virulento de la EM
vvMDV	Virus muy virulento de la EM
vv+MDV	Virus muy virulento plus de la EM

LITERATURA CITADA

Bacon LD, Witter RL. Influence of B-haplotype on the relative efficacy of Marek's disease vaccines of different serotypes. *Avian Dis* 1993; 37:53-59.

Baigent SJ, Smith LP, Currie JW, Nair VK. Replication kinetics of Marek's disease vaccine virus in feathers and lymphoid tissues using PCR and virus isolation. *J Gen Virol* 2005; 86:2989-2998.

Baigent SJ, Smith LP, Nair VK, Currie RJ. Vaccinal control of Marek's disease: current challenges, and future strategies to maximize protection. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 112(1-2):78-86.

Bankowski R, Moulton J, Mikami T. Characterization of Cal-1 strain of acute Marek's disease agent. *Am J Vet Res* 1969; 30 (9):1667-1676.

Biggs P. The history and biology of Marek's disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 2001; 255:2-23.

Biggs P. A discussion on the classification of the avian leucosis complex and fowl paralysis. *Brit Vet J* 1961; 117:326-334.

Calnek BW. Pathogenesis of Marek's disease virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2001; 255: 25-55.

Calnek BW, Witter RL. Marek's Disease virus. In: *Disease Poultry*, 9th ed. Calnek BW, Bames HJ, Beard CW, McDougald LR, and Saif YM. Eds. Iowa State University Press Ames, IA. 1997: 369 -413.

Calnek BW, Lucio B, Schat KA, Lillehoj HS. Pathogenesis of Marek's disease virus-induced local lesions. 1. Lesion characterization and cell line establishment. *Avian Dis* 1989; 33: 291 – 302.

Calnek BW. Marek's disease-a model for herpesvirus oncology. *Crit. Rev Microbiol* 1986; 12: 293-320.

Calnek B, Schat K, Peckham M, Fabricant J. Field trials with a bivalent vaccine (HVT and SB-1) against Marek's disease. *Avian Dis* 1983; 27: 844-849.

Cantello JL, Parcels MS, Anderson AS, Morgan RW. Marek's Disease Virus Latency-Associated Transcripts Belong to a Family of Spliced RNAs That Are Antisense to the ICP4 Homolog Gene. *J Virol* 1997; 71: 1353-1361.

Davidson I, Borenshtain R, Weisman Y. Molecular identification of Marek's disease virus vaccine strain CVI988 in vaccinated chickens. *J Vet Med* 2002; 49: 83-87.

Davidson I, Borenshtain R. In vivo events of retroviral long terminal repeat integration into Marek's disease virus in commercial poultry: detection of chimeric molecules as a marker. *Avian Dis*. 2001; 45 (1):102-121.

DeLuca NA, McCarthy AM, Schaffer PA. Isolation and characterization of deletion mutants of herpes simplex virus type 1 in the gene encoding immediate-early regulatory protein ICP4. *J Virol* 1985; 56: 558-570.

Endoh D, Kon Y, Hayashi M, Morimura T, Cho KO, Iwasaki T, Sato F. Detection of transcripts of Marek's disease virus serotype 1 ICP4 homologue (MDV1 ICP4) by in situ hybridization. *J Vet Med Sci* 1996; 58: 969-975.

Fenner FJ, Gibbs EPJ, Murphy FA. Herpesviridae. In *Veterinary virology*. Fenner F *et al*. Academia Press. 1993: 301-324.

Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Recaniello VR, Skalka AM. Herpesviruses. In: *Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*. Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Recaniello VR, Skalka AM. Asm Press. Washington, D. C, 2000: 774-776.

Gimeno I, Witter R, Reed W. Four distinct neurologic syndromes in Marek's disease: effect of viral strain and pathotype. *Avian Dis* 1999; 43: 721-737.

Günther BM, Klupp BG, Gravenyck M, Lohr JE, Mettenleiter TC, Kaleta EF. Comparison of the genomes of 15 avian herpesvirus isolates by restriction endonucleases analysis. *Avian pathol* 1997; 26: 305-316.

Handberg KJ, Nielsen OL, Jorgensen PH. The use of serotype 1 and serotype 3 specific polymerase chain reaction for the detection of Marek's disease virus in chickens. *Avian Pathol* 2001; 30: 243-249.

Hitchner S, Calnek BW. Inactivated vaccine for parrot herpesvirus infection (Pacheco's disease). *Am J Vet Res* 1980; 41:1280-1282.

James FX, *et al.* Characterization of a Herpesvirus associated with tracheitis in Gouldian Finches (*Erythrura [Chloebia] gouldiae*) *J Clin Microbio* 2003; 41: 4054-4057.

Jang KH, Niikura M, Song SC, Mikami T. Characterization and expression of the Marek's disease virus serotype 2 glycoprotein E in recombinant baculovirus-infected cell: initial analysis of its DNA sequence and antigenic properties. *Virus research* 1997; 48: 11-123

Karsten T. *et al.* A DNA vaccine containing an infectious Marek's disease virus genome can confer protection against tumorigenic Marek's disease in chickens. *J Gen Virol* 2002; 83:2367-2376.

Kattar-Cooley P, Wilcox KW. Characterization of the DNA-binding properties of herpes simplex virus regulatory protein ICP4. *J Virol* 1989; 63: 696-704.

Lee L, Kieff E, Bechenheimer S, Roizman B, Spear P, Burmester B, *et al.* Size composition of Marek's disease virus Deoxyribonucleic Acid. *J Virol* 1971; 7: 289-294.

Lupiani B, Lee LF, Reddy SM Protein –Coding content of the sequence of Marek's Disease Virus Serotype 1 *Curr Top Microbiol Immunol* 2001; 255: 159-189.

Malagró W Jr, Franco HM, Matheucci E Jr, Medaglia A, Silva FE. Large scale sex typing of ostriches using DNA extracted from feathers. BMC Biotechnology 2002; 2: 1-4

Mc Ferran JB, Mc Nulty. Herpesviridae. In: Virus Infections of vertebrates. Virus Infections of birds. Vol 4 Mc Ferran JB, Mc Nulty MS. Elsevier. The Netherlands. 1993: 17-18.

McKie EA, Ubukata E, Hasegawa S, Zhang S, Nonoyama M, Tanaka A. The transcripts from the sequences flanking the short component of Marek's disease virus during latent infection form a unique family of 3'-coterminal RNAs. J Virol 1995; 69 (2): 1310-1314.

Michelson S. Aspects moléculaires du Cytomegalovirus Human. Institut Pasteur, Paris, France. 1999.

Morgan RW, Xie Q, Cantello JL, Miles AM, Bernberg EL, Kent J, Anderson A. Marek's disease virus latency. Curr Top Microbiol Immunol 2001; 43: 255-223.

Moriguchi R, Yoshida H, Fujimoto Y, Mikami T, Izawa H. Feather Pulp lesions in chickens with naturally occurring Marek's disease lymphomas. Avian Dis 1986; 31: 156 -167.

Moriguchi R, Yoshida H, Fujimoto Y, Mikami T, Izawa H. Chronological observations of Marek's disease associated feather-pulp lesions in field chickens. Avian Dis 1985; 30: 284-291.

Muller MT, Binding of the herpes simplex virus immediate-early gene product ICP4 to its own transcription start site. J Virol 1987; 61: 858-865.

Parcells MS, Arumugaswami V, Prigge JT, Pandya K, Dienglewicz R. L. Marek's disease virus reactivation from latency: changes in gene expression at the origin of replication. Poult Sci 2003; 82: 893-898.

Payne L. The history of Marek's disease. World poultry Elsevier 1997; 6-7.

Payne L, Biggs P. Studies on Marek's disease. II. Pathogenesis. J. Nat. Cancer Inst. 1967; 39: 281-302.

Pereira L, Wolff MH, Fenwick M, Roizman B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. V. Properties of α polypeptides made in HSV-1 and HSV-2 infected cells. Virology. 1977; 77: 733-749.

Peterson T, Preston VG, Everett RD. A mutant of herpes simplex virus type 1 immediate-early polypeptide Vmw175 which binds to the capsite of its own promoter in vitro yet fails to autoregulate in vivo. J Gen Virol 1989; 71: 851-861.

Petrone VM, Hernández X, Téllez G. Enfermedad de Marek. Vet Méx 2000; 31: 355-369.

Rispens B, Van Vloten H, Mastenbroek N, Maas H, Schat K. Control of Marek's disease in the Netherlands. I. Isolation of an avirulent Marek's disease virus (strain CVI 988) and its use in laboratory vaccination trials. Avian Dis 1972; 16: 108-125.

Roizman B. Herpesviridae: A Brief Introduction. In: Fundamental Virology. Fields, B. L., Knipe D. M. Raven Press . New York , 1991: 841-847.

Sharma JM. Marek's disease. *In*: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, Fourth Edition. Swayne D.E. *et al.*, eds. American Association of Avian Pathologists. 1998: 116-124.

Schat K, Calnek B, Fabricant J. Characterisation of two highly oncogenic strains of Marek's disease virus. Avian Pathology 1982; 11:593–605.

Shamblin CE, Greene N, Arumugaswami V, Dienglewicz RL, Parcels MS. Comparative analysis of Marek's disease virus (MDV) glycoprotein-, lytic antigen pp38- and transformation antigen Meq-encoding genes: association of meq mutations with MDVs of high virulence. Vet Microbiol 2004; 102: 147-67.

Silva RF, Lee LF, Kutish GF. The genomic structure of Marek's disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 2001; 255: 143-58.

Smith CA, Schaffer PA. Mutants defective in herpes simplex virus type 2 ICP4: isolation and preliminary characterization. *J Virol* 1986; 66: 1092-1097.

Suter M, Lew A, Grob P, Adema G, Ackermann M, Shortman K, Fraefel C. BAC-VAC, a novel generation of (DNA) vaccines: a bacterial artificial chromosome (BAC) containing a replication-competent, packaging-defective virus genome induces protective immunity against herpes simplex virus 1. *PNAS* 1999; 96: 12697-12702.

Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, Peaterson JE, Reed WM. Marek's Disease. In: *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 4th ed. Jagdev M. Sharma. The American Association of Avian Pathologists. Florida, USA. 1998: 116-124.

Tomaszewski E, Wilson V, Wigle WL, Phalen D. Detection and Heterogeneity of Herpesviruses Causing Pacheco's Disease in Parrots. *J Clin Microbiol* 2001; 39:533 – 538

URL: http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00103.htm

URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=10292&lvl=3&p=mapview&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&keep=1&srchmode=1&unlock

Witter P. the histopathology of transient paralysis of the domestic fowl. *Vet Rec* 1968; 82:749-755.

Witter L, Schat A. Marek's Disease virus. In: *Disease of Poultry*, 11th ed. Saif Y, Calnek B, Barnes H, Beard C, McDougald L, and Saif Y. Eds. Iowa State University Press, Ames, IA. 2003, 405-465.

Witter R. Protective efficacy of Marek's disease vaccines. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2001; 255: 57-90.

Witter R. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Dis* 1997; 41: 149-163.

Witter R, Lee L, Fadly A. Characteristics of CVI988/Rispens and R2/23, two prototype vaccine strains of serotype 1 Marek's disease virus. *Avian Dis* 1995; 39: 269-284.

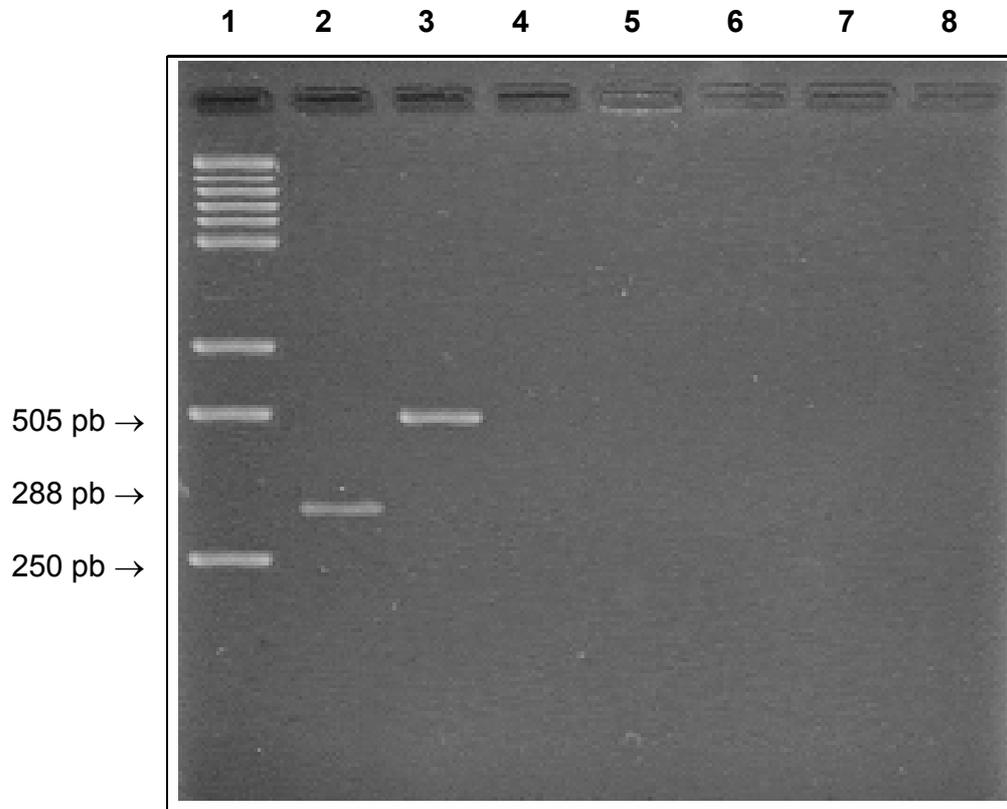
Witter R, Lee L. Polyvalent Marek's disease vaccines: safety, efficacy and protective synergism in chicken with maternal antibodies. *Avian Pathol* 1984; 13: 75-92.

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

Witter R. Protection by attenuated and polyvalent vaccines against highly virulent strains of Marek's disease virus. *Avian Pathol* 1982; 11: 49-62.

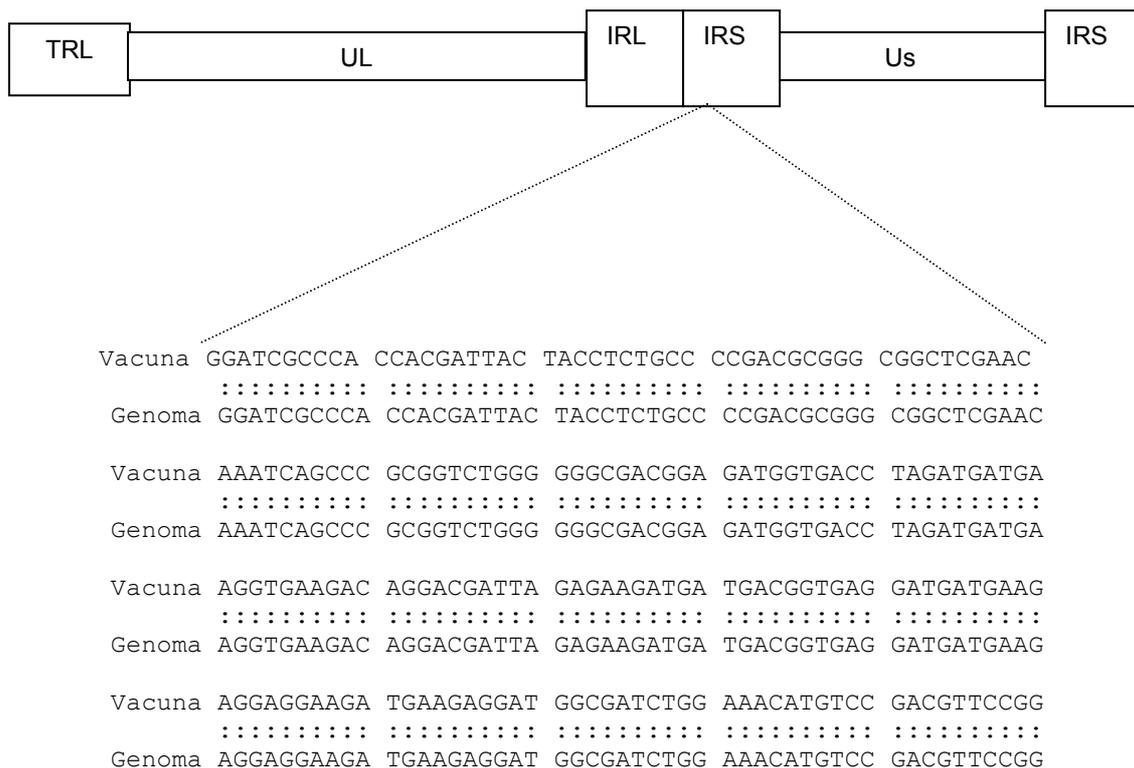
Yunis R, Jarosinski KW, Schat KA. Association between rate of viral genome replication and virulence of Marek's disease herpesvirus strains. *Virology* 2004; 328(1): 142-150.

Figura 1.- Resultados de la prueba de PCR estandarizada, en la que se muestra la amplificación del gen ICP4 del virus de la enfermedad de Marek, de una vacuna monovalente y de la vacuna del virus HVT con la cepa FC126.



Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: vacuna serotipo 1 CVI988; carril 3: vacuna con serotipo 3 del herpesvirus del pavo cepa FC126.

Cuadro 1.-Análisis de secuenciación y comparación de la cepa CVI988 del virus de la EM con la base de datos de la secuencia de este virus, reportada en el genbank con el número de localización U17701.



La primera línea corresponde a la secuenciación de la vacuna CVI988 y la segunda línea al genoma reportado para el herpesvirus de la enfermedad de Marek del serotipo 1, localizado en el genbank con el número U17701. Estos datos fueron analizados con el programa **Workbench** disponible en Internet URL: <http://workbench.sdsc.edu/>

Tabla 1.- Resultados del diagnóstico clínico patológico de cada caso sospechosos de la EM después de analizar la historia clínica y la realización de necropsia de aves con signos nerviosos.

No. Caso	Número de aves por caso	Fecha	Fin zootécnico	Edad	Historia de vacunación	Revisión antemortem	Hallazgos a Necropsia	Diagnóstico patológico
1	3	22/11/2004	1	Desconocida	No remitida	Parálisis de patas	Aumento de tamaño bilateral del plexo braquial y de nervio ciático	Enfermedad de Marek
2	1	30/11/2004	1	24 meses	No remitida	Incoordinación	Engrosamiento leve bilateral del nervio ciático	Enfermedad de Marek
3	1	02/06/2005	1	24 meses	Vacunada	alas caídas y debilidad en patas	Sin necropsia	Enfermedad de Marek
4	4	01/07/2005	1	15 semanas	No remitida	flacidez del cuello y alas, diarrea	Enteritis y neumonía	No compatible con ninguna enfermedad
5	6	04/07/2005	2	36 semanas	No remitida	Claudicación		<i>Mycoplasma synoviae</i>
6	6	04/07/2005	2	28 semanas	No remitida	claudicación	Espondilolistesis	<i>Mycoplasma synoviae</i>
7	3	12/08/2005	1	20 semanas	Vacunada	Alas caídas, claudicación, incoordinación	Aumento de tamaño unilateral del plexo braquial y nervio ciático	Enfermedad de Marek
8	2	05/09/2005	1	16 semanas	No remitida	Alas caídas, claudicación, incoordinación	Aumento de tamaño unilateral de plexo braquial	Enfermedad de Marek
9	5	22/11/2005	1	32 semanas	No remitida	secreción nasal, diarrea acuosa, incoordinación	Neumonía, equimosis en duodeno	Proceso viral, deshidratación severa
10	5	29/12/2005	3	10 semanas	Vacunada SB1/HVT	Parálisis de patas	Aumento de tamaño unilateral de Nervio ciático	Enfermedad de Marek
11	5	26/01/2006	1	12 meses	No remitida	Estornudo, torticolis incoordinación, parálisis	Hemorragias en tonsilas cecales	Probable influenza aviar

Fin zootécnico: "1" Ave de combate, "2" Reproductores, "3" Gallina de postura.

Tabla 2. Resultados de la prueba de PCR realizada en aves con presentación nerviosa sugestivo a la EM

No. Caso	Número de aves por caso	Nervio	Encéfalo	Pulmón	Hígado	Bazo	Pluma
1	3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1/1 positiva a CVI988
3	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	2/4 positivo a CVI988
5	6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
6	6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
7	3	2/3 positivas a CVI988	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
8	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1/ 2 positivo a CVI988/HVT
9	5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
10	5	(-)	(-)	1/5 positivo a FC126	(-)	(-)	(-)
11	5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Fin zootécnico: “1” Ave de combate; “2” Reproductores; “3” Gallina de postura.

Tabla 3.- Resultados del diagnóstico clínico patológico de cada caso clínico de aves sin signos nerviosos después de analizar la historia clínica y la realización de necropsias.

No. caso	Número de aves por caso	Fecha	Fin zootécnico	Historia de vacunación	Edad	Revisión antemortem	Hallazgos a Necropsia	Diagnóstico patológico
1	2	09/09/2005	1	No remitida	24 meses	secreción nasal y vómito color crema lechoso	Exudado amarillo con hemorragias en pulmón	Neumonía de origen bacteriano
2	5	14/10/2005	1	No remitida	Adulto	Diarrea mucosa	<i>Ascaris spp</i> , artritis serofibrinosa unilateral	Enteritis por parasitosis severa
3	6	14/10/2005	1	No remitida	Adulto	Diarrea mucosa	Exudado fibrinopurulento amarillo en sacos aéreos, nemátodos en intestino	Estomatitis fibrinopurulenta por parasitosis severa aereosaculitis fibrinopurulenta
4	5	14/10/2005	1	No remitida	Adulto	Diarrea mucosa	Hiperemia leve en laringe y traquea nemátodos abundantes	Enteritis hemorrágica severa por parasitosis
5	1	26/10/2005	1	No remitida	Adulto	Ave clínicamente sana	-----	-----
6	5	07/12/2005	2	No remitida	Adulto	Baja en la producción de Huevo	Áreas neumónicas, tonsilas hemorrágicas	Proceso séptico-necrótico generalizado

Fin zootécnico: "1" Ave de combate; "2" Reproductores; "3" Gallina de postura.

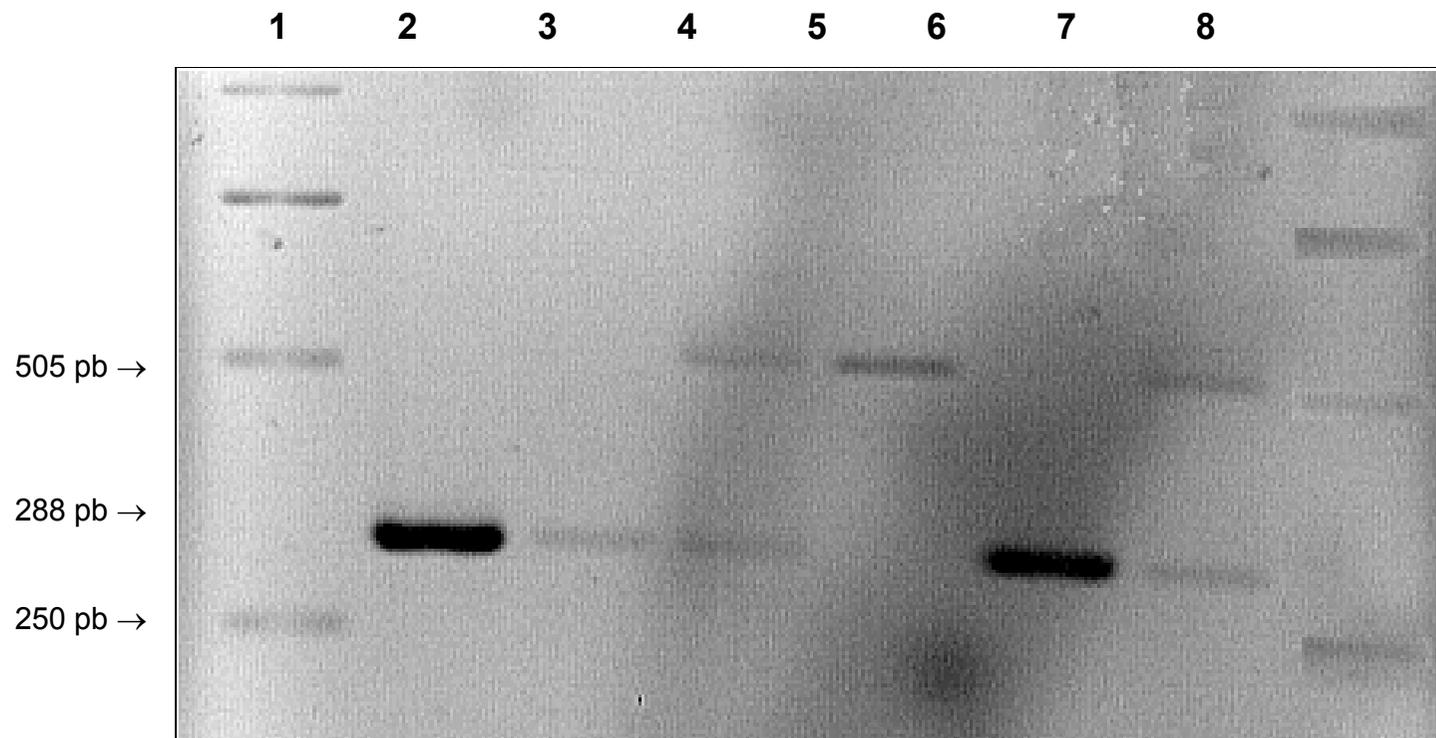
Tabla 4. Resultados de la prueba de PCR realizada en aves sin presentación nerviosa

No. Caso	Número de aves por caso	Nervio	Encéfalo	Pulmón	Hígado	Bazo	Pluma
1	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1/1 positiva a FC128
6	5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Aves monitoreadas para observar si presentaban el virus de la EM, sólo un caso positivo a la PCR fue detectado a partir de la pluma.

Fin zootécnico: “1” Ave de combate; “2” Reproductores; “3” Gallina de postura.

Figura 2. Gel de agarosa al 2% que muestra casos positivos de aves que presentaron problemas nerviosos.



Carril 1 y 8 = Marcador de peso molecular; Carril 2, 3, 6 = positivo a la cepa CVI988
Carril 4 = positivo a las cepas CVI988 / HVT; Carril 5 = positivo a la cepa FC126
Carril 7 = Control positivo de cepas vacunales CVI988 y FC126.

