

01672

9



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

*Estudio histopatológico e inmunológico de  
las enfermedades linfoproliferativas de las gallinas  
en México*

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

*Veterinaria*

PRESENTADO POR

RAMON MIGUEL MOLINA BARRIOS

298716

TUTOR:

DR. FRANCISCO J. TRIGO TAVERA

COMITE TUTORAL

TAMAS FEHERVARI BONE  
GUILLERMO TÉLLEZ ISAÍAS



MÉXICO, D.F.

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

---

**MVZ. RAMON MIGUEL MOLINA BARRIOS**

**AUTOR**

## **DEDICATORIAS:**

A mis padres, J. Ramón Molina G. y Dolores Barrios Angeles, por su amor, fortaleza y dedicación para sacar adelante a su familia, siendo un ejemplo a seguir.

A mi esposa Maria Esthela por su confianza, paciencia y gran apoyo para alcanzar una etapa más en mi desarrollo profesional.

A mis hijos, José Roberto, Mayra Alejandra y Luis Fernando, por ser mi motivo principal de superación.

## **AGRADECIMIENTOS:**

A Dios, por la oportunidad de disfrutar lo maravilloso de la vida y permitirme alcanzar las metas que me he propuesto.

A mis asesores Francisco Trigo T., Tamas Fehervari y Guillermo Tellez, por la orientación en el desarrollo de mis estudios.

A la Facultad de Medicina y Zootecnia de la U.N.A.M. por haberme permitido formar parte de ella.

A mi amigo Rafael Colín Flores por su apoyo incondicional en los momentos importantes. La distancia no importa en la amistad verdadera.

## RESUMEN

Las enfermedades linfoproliferativas de las aves, se han asociado a leucosis aviar y la enfermedad de Marek. El diagnóstico de estas enfermedades se basa en criterios epidemiológicos y patológicos, en la especie animal afectada, la edad de presentación, lesiones y el tipo celular. El estudio histopatológico de los tumores es una clave importante, pero no es patognomónico, por lo tanto, el uso de técnicas inmunohistoquímicas para la determinación del tipo de células transformadas o antígenos asociados a los virus es necesario. Los objetivos de este estudio fueron evaluar la histopatología y las inmunoperoxidasa en el diagnóstico de las enfermedades linfoproliferativas de las gallinas, así como demostrar la presencia del virus de la reticuloendoteliosis en México. Esta investigación incluye 30 casos diagnosticados como leucosis linfoide y 20 como enfermedad de Marek, que fueron procesados por técnicas histológicas de rutina y para pruebas de inmunoperoxidasa con anticuerpos monoclonales contra el virus de la leucosis aviar, el virus de la reticuloendoteliosis, antígenos de superficie asociados a Marek, así como los marcadores de linfocitos CD8, CD4 e IgM. Se utilizó un equipo comercial Histostain-SP, modificando su protocolo. Dos técnicas para recuperación de antígenos fueron usados, un calentamiento en microondas en solución de un amortiguador de citrato y un tratamiento enzimático con tripsina. Los casos de leucosis linfoide, tuvieron una deficiente selección de muestras, 27/30 de los casos presentaron características citológicas concordes con la literatura, las células correspondieron a linfocitos B identificados por su marcador IgM. Se demostró pobre concordancia entre inmunoperoxidasa e histopatología, haciendo necesaria la identificación inmunohistoquímica para un diagnóstico exacto. Con relación a la enfermedad de Marek, la presentación clásica fue diagnosticada en 18/20 casos, los antígenos de superficie asociados a Marek y CD4, fueron identificados en el 100% de los casos. Nosotros proponemos que los laboratorios avícolas deben uniformar sus diagnósticos para la enfermedad de Marek. No hubo evidencia de la presencia de antígenos del virus de la reticuloendoteliosis en las lesiones linfoproliferativas de los órganos en esta investigación.

## ABSTRACT

Lymphoproliferative diseases of chickens have been associated to Marek's disease and lymphoid leukosis. Diagnosis is based on epidemiological and the pathological pattern: species, age, lesions and transformed cells. The histopathological pattern is an important clue, but it is not pathognomonic, therefore an immunohistochemical assay to determinate type of transformed cells or associated viral antigens is necessary. Comparative studies on histopathological and immunoperoxidase techniques were objectives. This investigation included organs of 30 cases with diagnosis of Lymphoid leukosis and 20 cases diagnosed as Marek's disease, which were prepared by standard histological techniques and immunoperoxidase assays performed using monoclonal antibodies versus associated antigens of Avian leukosis virus, Reticuloendoteliosis virus, Marek associated surface antigens (MATSA) and CD8, CD4 and IgM lymphocyte antigens. The procedure time of a Histostain-SP commercial kit protocol was modified. Two retrieval antigens techniques were used, a microwave heating in citrate buffer and a trypsin treatment. The cases of Lymphoid leukosis had an uncompleted selection of organs, 27/30 cases had a cellular pattern similar of published reports, 27/30 were positive to ALV and IgM antigens. Concordance test showed low results for histological techniques, therefore immunohistochemical studies were necessary for a specific diagnosis for lymphoid leukosis. About Marek's disease, classical presentation was diagnosed in 18 / 20 cases, MATSA and CD8 antigens were detected on 100% of confirmed cases. We proposed that the avian laboratories from Mexico, should have uniformity on their diagnoses about Marek's disease. There was no evidence of Reticuloendoteliosis virus antigens on lymphoproliferative lesions of the organs in this investigation.

## CONTENIDO

<b>I. DEDICATORIAS</b>	.....	<b>III</b>
<b>II. RESUMEN</b>	.....	<b>IV</b>
<b>III. ABSTRACT</b>	.....	<b>V</b>
<b>IV. CONTENIDO</b>	.....	<b>VI</b>
<b>V. LISTA DE FIGURAS</b>	.....	<b>VIII</b>
<b>VI. LISTA DE ABREVIATURAS</b>	.....	<b>X</b>
<b>1.0 INTRODUCCIÓN</b>	.....	<b>1</b>
<b>2.0 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	.....	<b>3</b>
<b>3.0 REVISION DE LITERATURA</b>		
<b>3.1 ENFERMEDAD DE MAREK</b>		
<b>3.1.1 Etiología</b>	.....	<b>4</b>
<b>3.1.2 Epizootiología</b>	.....	<b>5</b>
<b>3.1.3 Patogénesis</b>	.....	<b>6</b>
<b>3.1.4 Signología</b>	.....	<b>7</b>
<b>3.1.5 Patología</b>	.....	<b>7</b>
<b>3.1.6 Inmunidad</b>	.....	<b>8</b>
<b>3.1.7 Diagnóstico</b>	.....	<b>8</b>
<b>3.2 LEUCOSIS AVIAR</b>		
<b>3.2.1 Etiología</b>	.....	<b>9</b>
<b>3.2.2 Epizootiología</b>	.....	<b>10</b>
<b>3.2.3 Patogénesis</b>	.....	<b>11</b>
<b>3.2.4 Signología</b>	.....	<b>11</b>
<b>3.2.5 Patología</b>	.....	<b>12</b>

<b>3.2.7 Diagnóstico</b>	.....	<b>13</b>
<b>3.3 RETICULOENDOTELIOSIS</b>		
<b>3.3.1 Etiología</b>	.....	<b>13</b>
<b>3.3.2 Epizootiología</b>	.....	<b>14</b>
<b>3.3.3 Patogénesis</b>	.....	<b>15</b>
<b>3.3.4 Signología</b>	.....	<b>16</b>
<b>3.3.5 Patología</b>	.....	<b>16</b>
<b>3.3.7 Diagnóstico</b>	.....	<b>17</b>
<b>3.4 INMUNOHISTOQUÍMICA</b>	.....	<b>17</b>
<b>4.0 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	.....	<b>19</b>
<b>5.0 RESULTADOS</b>	.....	<b>32</b>
<b>6.0 DISCUSIÓN</b>	.....	<b>35</b>
<b>7.0 CONCLUSIONES</b>	.....	<b>37</b>
<b>8.0 LITERATURA CITADA</b>	.....	<b>47</b>



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.- Enfermedad de Marek, presentación clásica, corte de nervios con infiltrado linfocítico focal (100x), H&E.
- Figura 2.- Enfermedad de Marek, corte de bazo con hiperplasia reticuloendotelial severa. (40x), H&E.
- Figura 3.- Enfermedad de Marek, corte de bazo con hiperplasia reticuloendotelial y nódulo bien delimitado, basofílico, con ligero monomorfismo celular, denominado nódulo preneoplásico (100x), H&E.
- Figura 4.- Enfermedad de Marek, corte de miocardio con infiltrado de células reticulares y escasos linfocitos, clasificado como infiltrado y tipo B (100x), H&E.
- Figura 5.- Enfermedad de Marek, corte de proventrículo con de nódulo linfoide bien delimitado en su capa glandular, mostrando patrón celular monomórfico (40x), H&E
- Figura 6.- Enfermedad de Marek, corte de bazo con abundantes células linfoides positivas a antígenos MATSA con distribución en su membrana celular (40x) H&E.
- Figura 7.- Enfermedad de Marek, corte de bazo con abundantes células reactivas a los antígenos CD4 utilizando la prueba de inmunoperoxidasa con anticuerpos monoclonales (400x).
- Figura 8.- Leucosis linfoide, corte de hígado con infiltrado linfocítico abundante con un patrón infiltrativo, desplazando los sinusoides hepáticos (40x), H&E.
- Figura 9.- Leucosis linfoide, corte de riñón con infiltrado linfocítico severo, con un patrón celular monomórfico y basofílico (100x), H&E.
- Figura 10.- Leucosis linfoide, corte de hígado con presencia de células linfoides con patrón nuclear monomórfico (400).
- Figura 11.- Leucosis linfoide, corte de hígado con infiltrado de células con patrón nuclear pleomórfico, cromatina condensada y nucleolos aparentes (100x). H&E.

Figura 12.- Leucosis linfoide, corte de neoplasia en serosa intestinal con células linfoides reactivas a la presencia de antígenos citoplasmáticos de ALV utilizando la prueba de inmunoperoxidasa y anticuerpos monoclonales (400x).

Figura 13.- Leucosis linfoide, corte de hígado con células neoplásicas linfoblásticas con reactividad a IgM positiva, mediante la prueba de inmunoperoxidasa (400x).

Figura 14.- Leucosis linfoide, corte de neoplasia linfoide en hígado células linfoides fuertemente positiva a IgM., mediante la prueba de inmunoperoxidasa (400x).

## LISTA DE ABREVIATURAS

AEC	.- Amino-etilcarbazol
AGID	.- Inmunodifusión en gel agar.
AL	.- Leucosis aviar.
ALSV	.- Virus del grupo sarcoma de Leucosis aviar.
ALV	.- Virus de la Leucosis aviar.
BF	.- Bolsa de Fabricio.
CAIV	.- Virus de la anemia infecciosa de los pollos.
CSV	.- Virus sincitial del pollo.
DNA	.- Acido desoxiribonucleico.
EUA	.- Estados Unidos de Norteamérica.
ELISA	.- Ensayo inmunoenzimático asociado a enzimas.
HVT	.- Herpesvirus de pavo.
IFA	.- Prueba de inmunofluorescencia.
LL	.- Leucosis linfoide.
LPDV	.- Enfermedad linfoproliferativa de los pavos.
MATSA	.- Antígenos de superficie de células transformadas asociadas a Marek.
MD	.- Enfermedad de Marek.
MDV	.- Virus de la enfermedad de Marek.
(nd)	.- Replicación no defectivo.
PCR	.- Reacción en cadena de la polimerasa.
(rd)	.- Replicación defectiva.
RE	.- Reticuloendoteliosis.
REV	.- Virus de la Reticuloendoteliosis aviar.
RNA	.- Acido ribonucleico.
RSV	.- Virus del sarcoma de Rous.
RS	.- Sarcoma de Rous
SNV	.- Virus de la necrosis esplénica.

## 1.0. INTRODUCCION

Las enfermedades neoplásicas de las gallinas, se han atribuido a 2 familias virales: *alfaherpesviridae* causante de la Enfermedad de Marek (MD) y *retroviridae*; básicamente 3 especies de retrovirus aviares pueden causar enfermedad en las aves y que incluyen: el virus de la Enfermedad linfoproliferativa de los pavos (LPDV), los virus del grupo leucosis sarcoma (ALSV) y los virus de la Reticuloendoteliosis (REV) (Payne, 1998; Witter, 1997a).

Se han descrito dos enfermedades neoplásicas importantes de origen vírico en la avicultura, la Enfermedad de Marek y Leucosis aviar (ALV), aunque ambas enfermedades pueden presentar lesiones macroscópicas similares, es posible su diferenciación por sus características histológicas. Sin embargo, han emergido nuevas enfermedades neoplásicas linfoproliferativas como reticuloendoteliosis y la enfermedad linfoproliferativa de los pavos. Actualmente, el diagnóstico de estas enfermedades se basa en criterios epidemiológicos y patológicos: en la especie animal afectada, la edad de presentación, la localización de las lesiones y el tipo celular predominante en el infiltrado (Fadly, 1997b; Payne, 1997).

El diagnóstico clínico de las lesiones inducidas por REV o MD en una parvada afectada es problemático, los linfomas de células T producidos por REV, son macroscópica y microscópicamente semejantes a las causadas por MDV, mientras que los linfomas de células B, son similares a los inducidos por ALV, por lo tanto, el diagnóstico de ALV-REV y MD-REV debe ser basado en el aislamiento viral y la demostración de anticuerpos específicos (Davidson, 1995; Fadly, 1996).

Existen dos corrientes de investigación sobre el diagnóstico y pruebas aplicables. Un grupo, considera los criterios virológicos y serológicos, particularmente poco útiles, debido a la distribución frecuente de virus de MD, RE y AL en las parvadas comerciales de Estados Unidos y la presencia de infecciones sin manifestaciones neoplásicas y se recomienda el uso de la determinación del tipo de células transformadas, apoyados en técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos policlonales y monoclonales contra antígenos de leucocitos B y T; Sin embargo, otros

investigadores apoyan los criterios virológicos y serológicos, con base en la posibilidad de infecciones mixtas con estos virus, modificando las características histológicas de estos tumores. Con respecto a REV, como no es un virus ubicuo como MDV y ALV, su presencia en tejidos tumorales, es conocida de significancia diagnóstica (Barth, 1990; Davidson, 1995; Fadly, 1996; Fadly, 1997b).

El estudio histopatológico de los tumores es un procedimiento de soporte valioso, pero debido a la gran variabilidad en los patrones infiltrativos, puede no ser patognomónico. Existe una buena correlación entre los hallazgos histopatológicos y la detección de secuencias de DNA del virus de MD, cuando no encontraron evidencia de infección por REV; pero en casos de infección mixta, el examen histopatológico reveló características citológicas de MD, REV, REV/ALV (Davidson, 1995; Davidson, 1998).

La comparación del diagnóstico histopatológico con pruebas de inmunofluorescencia indirecta, ha demostrado que las pruebas inmunohistoquímicas son más confiables que el examen histológico (Cui, 1986; Kokuuslu, 1989).

En México, no existen informes de estudios con el virus de la reticuloendoteliosis, por lo que es importante establecerlo como un diagnóstico diferencial de los problemas infecciosos presentes en la avicultura del país. Considerando las experiencias sobre las enfermedades linfoproliferativas en otros países y la necesidad de un diagnóstico etiológico exacto de las enfermedades neoplásicas de tejido linfoide que afectan a las aves, este trabajo, pretendió comparar dos técnicas diagnósticas para el diagnóstico de las enfermedades linfoproliferativas de las gallinas, así como demostrar mediante inmunohistoquímica la presencia del virus de la reticuloendoteliosis en órganos, presentando neoplasias linfoides, diagnosticadas como MD o ALV en diferentes laboratorios del país.

## **2.0. HIPOTESIS**

Similarmente a la situación existente en la avicultura de otros países, el virus de la reticuloendoteliosis, se encuentra presente en parvadas comerciales del país, involucrándose en la presentación de neoplasias linfoides y cuadros clínicos inmunosupresivos, similares a los producidos por la enfermedad de Marek y Leucosis linfoides o en combinación con ellos. Por otro lado, se espera que los tipos de células linfoides que constituyan las neoplasias, tengan buena correlación con los tipos de antígenos virales detectados, permitiéndonos una mejor caracterización histológica de estas lesiones.

## **OBJETIVOS**

- a) Caracterizar histopatológicamente, los tipos de neoplasias linfoides presentes en las gallinas comerciales del país.
- b) Demostrar la presencia de antígenos virales de REV, MD y/o ALV en los tejidos tumorales y la presencia del virus de la reticuloendoteliosis aviar en parvadas de gallinas en México.
- c) Determinar los tipos predominantes de linfocitos en las neoplasias incluidas en el estudio.
- d) Establecer la correlación entre las características de células linfoides que constituyan las neoplasias y la presencia de antígenos virales de REV, MD y/o ALV.

### 3.0. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. ENFERMEDAD DE MAREK

Es un proceso linfoproliferativo neoplásico de las aves domésticas altamente contagioso, es producida por un herpesvirus y se caracteriza por la infiltración celular de tipo mononuclear y el desarrollo de linfomas, principalmente en órganos viscerales y nervios periféricos. Es un serio problema económico, a pesar de las medidas de control por medio de vacunación (Powell, 1993; Kreager, 1998).

##### 3.1.1. ETIOLOGÍA

Los virus de la enfermedad de Marek (MDV) son considerados miembros de la subfamilia Alfaherpesvirinae de la familia Herpesviridae. Han sido designados como Herpesvirus Gallid 2. Son virus DNA de cadena doble, con nucleocápside icosaédrica, 162 capsómeros cilíndricos. Se ha subdividido en 3 serotipos antigénicamente relacionados: el serotipo 1 corresponde a cepas patógenas e inductoras de enfermedades linfoproliferativas en pollos susceptibles, el serotipo 2 incluye cepas naturalmente apatógenas y el serotipo 3 comprende a un virus no patógeno de origen de pavos, utilizado ampliamente como vacuna (Arshad, 1997b; Silva, 1997; Witter, 1997a).

Las características químicas y biológicas de los virus de MD han sido descritas ampliamente. Todos los aislamientos de MDV y HVT producen efectos citopáticos, sin embargo, su comportamiento *in vitro*, no tiene correlación con su virulencia *in vivo*, para producir tumores. Se ha una relación entre la inmunosupresión debida al efecto citolítico agudo de los órganos linfoides y la expresión oncogénica de los virus (Calnek, 1998a; Witter, 1997b).

Los antígenos de virus de diferentes serotipos, son relacionados pero no idénticos. Se han descrito 6 antígenos en cultivos celulares de riñón de pollo, pero solo los antígenos A, B y C son reconocidos regularmente. Además de los antígenos definidos por análisis serológicos, existen otros que pueden ser blancos para las

reacciones mediadas por células, pero no han sido claramente identificados (Powell, 1993).

Witter *et. al.*, han establecido una clasificación con base a la habilidad de las cepas para inducir MD en pollos no vacunados y la protección vacunal contra el desafío con estas cepas y los ha identificado como: ligero(mMDV), virulento (vMDV), muy virulento (vvMDV) y muy virulento plus (vv+MDV) (Witter, 1997c; Witter, 1998).

### 3.1.2. EPIZOOTIOLOGÍA

Las gallinas son los únicos que manifiestan la enfermedad naturalmente, aunque puede ser producida en pavos y codornices. Se considera que la mayoría de las parvadas comerciales se encuentran infectadas por el virus de MD. Los mamíferos son refractarios a la enfermedad, no existiendo evidencia de riesgo a los humanos (Powell, 1993).

En las gallinas, el virus se disemina por contacto directo o indirecto, puede ser eliminado por heces y secreciones, pero la infección del virus en las células del folículo de la pluma, al asociarse a células queratinizadas, mantiene su infectividad por muchos meses en el medio ambiente, constituyendo el mayor riesgo de infección para las futuras parvadas. En los pavos, la infección por HVT, es poco importante, con menor replicación en células del folículo de la pluma (Biggs, 1997).

Las aves resistentes restringen la infección mostrando una reducción de título viral, coincidente con la presencia de anticuerpos y el desarrollo de inmunidad celular. La selección artificial de aves resistentes ha sido posible, pero los efectos sobre parámetros productivos son perjudiciales. Se han descrito mecanismos para resistencia genética a MDV, pero, ninguno reside en nivel de susceptibilidad celular a la infección. La resistencia asociada al alelo B21, depende de la inmunosobrevivencia, la presencia del alelo B2, produce diferencias en susceptibilidad de los linfocitos T, desarrollando una baja viremia en sangre y tejidos linfoides (Calnek, 1998b).



Los factores conocidos a influir la incidencia de tumores incluye: edad de exposición, presencia de anticuerpos maternos, constitución genética, cepa viral, sexo, inmunidad vacunal y condiciones complicantes (Witter, 1998b).

### 3.1.3. PATOGENESIS

La infección natural ocurre vía respiratoria, el sistema de macrófagos transportan el virus a circulación, produciendo una infección citolítica 3 a 7 días postinfección (p.i.), llevando a una linforeticulitis, agrandamiento del bazo, necrosis y atrofia linfoide en la bolsa de Fabricio (BF) y el timo con cambios inflamatorios acompañantes. En los pollos resistentes, los cambios inflamatorios se resuelven por el día 14 p.i., reestabliéndose su arquitectura, pero manteniendo un menor tamaño. Se desarrolla una viremia primariamente en los linfocitos B, a pesar que algunos linfocitos T pueden llegar a ser infectados. En pollos inmunocompetentes, la respuesta inmune, genera condiciones que determinan una infección replicativa-citolítica o una infección latente, principalmente sobre células T activadas. Esta activación celular es requerida para su susceptibilidad y esta población es parte de la respuesta inmune contra antígenos virales asociados con células B productivamente infectadas. Las citocinas, incluyendo interferón parecen estar involucradas en el mantenimiento de la latencia. Una inmunosupresión temporal, es asociada con el estadio temprano de la infección, debida probablemente a la pérdida de linfocitos y también por la presencia de macrófagos supresores de la respuesta inmune (Calnek, 1998b, Morimura, 1998; Witter, 1998).

En los pollos genéticamente susceptibles, la latencia es interrumpida por la aparición de una segunda onda de infección citolítica en los órganos linfoides y tejidos epiteliales, iniciando 4 o más semanas p.i. y coincidente con una inmunosupresión permanente. Su presentación puede ser degenerativa, inflamatoria, linfomatosa o combinaciones. En los pollos que sobreviven la infección, la inmunocompetencia se restituye y la infección latente persiste durante toda la vida del ave, evidenciada por la infección productiva escasa en el folículo de la pluma (Biggs, 1997; Powell, 1993, Witter, 1997a).

#### 3.1.4. SIGNOLOGIA

La presentación clásica se caracteriza por mortalidad menor al 15 %, los signos dependen de los nervios involucrados, llevando a una parálisis espástica progresiva de alas y patas, diarrea, impactación cloacal y pérdida de peso por afección de nervios intestinales. En la presentación aguda se observa una fase inicial de mortalidad alta (10-70%), continuada por mortalidad baja por largos períodos con presencia de tumores linfomatosos múltiples en órganos viscerales, cuya distribución, dependen de la cepa viral, dosis, edad del ave y constitución genética (Calnek, 1998a; McKay, 1998).

Una presentación menos común es una encefalitis aguda, denominada clínicamente como una parálisis temporal de Marek, se caracteriza por parálisis súbita de cuello y patas por períodos de 24-36 horas, pero con presentación posterior de neoplasias (Calnek, 1998).

#### 3.1.5. PATOLOGIA

En la presentación clásica, los nervios plexos braquiales, ciáticos y celíaco, vago abdominal y nervios intercostales aumentan 2-3 veces su grosor, con pérdidas de estriaciones, grisáceos y edematosos. Así como linfomas de apariencia suave, lobulados, grises y pequeños en los ovarios. En la presentación aguda, el aumento de tamaño de hígado, bazo, gónadas, riñones, pulmones, proventrículo y corazón es común, algunas veces, aparecen en piel, causando grandes pérdidas por decomiso en pollo de engorda (Payne, 1997).

Microscópicamente las lesiones neurales han sido clasificadas como tipo A, B y C. La lesión tipo A, es la más común, consiste de células linfoides constituidas por células reticulares activadas, linfoblastos y linfocitos. El tipo B es caracterizado por edema interneurítico, proliferación de células de Schwann e infiltrado de linfocitos y células plasmáticas. La lesión tipo C consiste de áreas pequeñas de infiltrado de linfocitos y células plasmáticas y puede detectarse en aves asintomáticas. En sistema nervioso central, los cambios son infiltración linfocítica perivascular, microgliosis y

endoteliosis. En la parálisis temporal, hay edema vasogénico, infiltración linfocítica perivascular, infiltrado linfocítico en meninges y gliosis focal o difusa. En órganos viscerales, la lesión más común es tumor linfoide con características tipo A. En la bolsa de Fabricio puede observarse cambios degenerativos y proliferativos en tejido interfolicular y atrofia prematura (Calnek 1993; 1998a; Witter 1998).

Aunque los tejidos no linfoides son poco susceptibles a la infección de MDV, se puede encontrar necrosis focal en riñón, asociada a cuerpos de inclusión, glomerulonefritis y necrosis glomerular, necrosis focal en páncreas, proventrículo, hígado y corazón. Las cepas muy virulentas pueden producir citólisis generalizada y muerte en pollos jóvenes (Powell, 1993; Calnek, 1998a).

#### 3.1.6. INMUNIDAD

La inmunidad celular es considerada importante, basada en la presencia necesaria de linfocitos T para la resistencia a la enfermedad. La citotoxicidad mediada por células contra líneas linfoblastoides de MD se realiza por linfocitos T y su antígeno blanco es MATSA, aunque los antígenos de histocompatibilidad pueden ser antígenos blanco. Los macrófagos también han demostrado inhibir la proliferación de células linfoblastoides y células mostrando antígenos MATSA *in vitro* (Calnek, 1998b; Schat, 1991).

La inmunosupresión es una característica prominente y resultante en falla de defensa contra el virus y células transformadas, puede ser explicada por la apoptosis causada en linfocitos circulantes durante la fase aguda, que indica células CD4+ pero no CD8+; en el timo, disminuyen drásticamente los linfocitos CD4+ y CD8+, indicando apoptosis de células inmaduras ( Calnek, 1998a).

#### 3.1.7. DIAGNOSTICO

El diagnóstico clínico de las lesiones inducidas por MD es problemático debido que su localización y apariencia macroscópica y microscópicamente puede ser

similar a los linfomas de células T producidos por REV, por lo tanto, el diagnóstico de MD-REV debe ser basado en la demostración de antígenos específicos o el aislamiento viral (Davidson, 1995; Fadly, 1996; Kreager, 1998).

Las lesiones microscópicas de MD involucran el engrosamiento de nervios periféricos y proventriculitis,. La infiltración linfocítica perivascular en cerebro es una característica de MD. En la bolsa de Fabricio, la lesión de MD es interfolicular, mientras que en LL es intrafolicular (Fadly, 1997c; Witter, 1991).

El aislamiento de MDV, es realizado en cultivos celulares de fibroblastos o riñón de pollo. Su replicación es cuantificada por la formación de placas y puede ser confirmada por inmunofluorescencia o microscopía electrónica (Powell, 1993; Silva, 1997).

### **3.2. LEUCOSIS LINFOIDE**

Leucosis linfoide es una enfermedad insidiosa que causa pérdidas económicas significantes debido a la mortalidad y efectos subclínicos sobre el desarrollo de ave, influyendo desfavorablemente en la edad de madurez sexual, producción de huevo, peso del huevo, fertilidad, incubabilidad, mortalidad inespecífica y peso corporal (Payne, 1998; Witter, 1997c).

#### **3.2.1. ETIOLOGÍA**

Este grupo de virus pertenece a la familia retroviridae, RNA virus negativos con una envoltura de alto contenido en lípidos, viriones relativamente termolábiles, pero resistentes a la exposición a solventes orgánicos se constituye por los virus de leucosis aviar, los virus del grupo sarcoma y los virus defectivos que producen leucemia aguda. Su principal determinante antigénico es la glicoproteína gp85 de la envoltura que determina la habilidad del virus para ligarse a su receptor específico en la membrana celular y también es determinante de los anticuerpos neutralizantes producidos por el huésped. Los virus de leucosis aviar se clasifican en 5 subgrupos

importantes A, B, C, D, y E que afectan a las gallinas domésticas y otros 4 grupos adicionales, que han sido recuperados de aves no comerciales. Recientemente un nuevo subgrupo clasificado como J se ha aislado de pollos de engorda, presentando gran capacidad oncogénica, a pesar de no ser portador de oncogenes (Fadly, 1998b; Payne, 1998; Calnek, 1998a; Witter, 1997c).

Los virus de AL también se clasifican por sus características biológicas. El subgrupo clasificado como lentamente transformante corresponde a retrovirus sencillos que no poseen oncogenes integrados a su genoma. Los virus altamente transformante tienen la misma estructura básica de los retrovirus, pero contienen en su genoma uno o dos oncogenes virales de localización variable asociados a defectos para replicación *in vitro* y se denominan defectivas para replicación (rd). Estos virus requieren la coinfección con otros virus no defectivo para complementar su defecto genético, resultando una mezcla fenotípica y es denominado seudotipo (Cui, 1996; Fadly, 1998b, Witter, 1997c).

### 3.2.2. EPIZOOTIOLOGIA

Los virus de ALV son ubicuos en las gallinas comerciales. El subgrupo A es común en EUA y Reino Unido, los grupos C y D han sido reportados en Finlandia. El grupo E corresponde a un virus endógeno y ha sido encontrado en varias especies de aves (Fadly, 1997c).

La selección genética en aves de engorda para emplume lento y resistencia a MD en aves ligeras, se ha asociado con la calidad de portador de virus endógenos (E) sin embargo su expresión es variable entre parvadas. La transmisión genética del virus endógeno EV21, incrementa la susceptibilidad de los pollos a infecciones con otros virus de ALV, siguiendo una infección al nacimiento, pero no en aves infectadas después de 4 semanas de edad (Gorbovitskaia, 1998; Nicolas, 1983; Payne, 1998; Witter, 1997c).

La transmisión ALV es primariamente vertical, produciendo que las aves infectadas, desarrollen inmunotolerancia con viremia persistente y mayor frecuencia de tumores. La infección horizontal estimula la producción de anticuerpos

neutralizantes y manifiestan pocas neoplasias; solo un bajo porcentaje de estas aves eliminan virus a su progenie (Darcel, 1996; McKay, 1998).

Se ha establecido la asociación de ciertas cepas del virus de MD, con un incremento en la presentación de leucosis linfoide, involucrando la transactivación de la transcriptasa reversa del virus y la disminución de la susceptibilidad a la apoptosis (Kreager, 1998; Marsh, 1998; Payne, 1998)

### 3.2.3. PATOGENESIS

Las células blanco para transformación neoplásica de los ALV, radican en bolsa de Fabricio. A tan pronto como 4 semanas p.i., se puede detectar una hiperplasia preneoplásica en uno o más folículos linfoides de la bolsa de Fabricio denominada. La mayoría de los folículos regresan, solo algunos desarrollan tumores nodulares, detectables por la semana catorce de edad. La proliferación folicular es clonal, pero debido a la progresión de varios folículos, los tumores diagnosticados pueden presentar características policlonales (Fadly, 1997c; Payne, 1997).

Existen dos tipos de mecanismos básicos para la inducción de tumores por los retrovirus aviares. Las cepas lentamente transformantes de ALV, producen la transformación neoplásica por un mecanismo denominado inserción de promotor. Los virus altamente transformantes, producen sus efectos mediante la inserción múltiple de genomas virales en el genoma huésped, resultando en expresión excesiva de estos genes, que terminan en cambios neoplásicos agudos cuya manifestación fenotípica es dependiente del tipo de oncogen (Gong, 1998; Payne, 1998).

La cepa J ( HPRS-103), se observa que manifiesta un alto tropismo por replicación en monocitos. La manifestación fenotípica de la infección por la cepa J (HPRS-103) de ALV, esta determinada por la susceptibilidad genética. Las gallinas de línea pesada, consideradas susceptibles a la infección, al parecer no controlan la infección y eventualmente llegan a ser anérgicas (Arshad, 1997a; Russel, 1997).

#### 3.2.4. SIGNOLOGIA

La infección por ALV puede resultar en el desarrollo de tumores; puede inducirse una lesión no neoplásica, manifestados por anemia, hepatitis, inmunodepresión; o puede producirse una infección subclínica que reduce el comportamiento productivo de la parvada (Payne, 1997, McKay, 1998).

LL ocurre esporádicamente, la mortalidad no es detectada antes de los 4 meses de edad y la mayoría de los casos ocurren entre 5 y 9 meses y puede alcanzar un 30% de la parvada. Una fase leucémica es demostrable en leucosis linfoide, mieloblastosis y eritroblastosis (Payne, 1997).

#### 3.2.5. PATOLOGIA

Los tumores de la leucosis linfoides ocurren en pollos mayores de 4 meses de edad y se caracterizan por hepatomegalia causada por la infiltración de linfoblastos, con un patrón de crecimiento difuso o miliar. En algunos casos en hígado presenta nodulaciones friables de color crema de hasta 5 cm de diámetro, pudiendo ocurrir presentaciones mixtas. También se pueden encontrar tumores en bazo, riñón, gónadas, pulmones, timo, médula ósea y mesenterio. En casi todos los casos la bolsa de Fabricio se involucra con tumores nodulares (Payne, 1993; 1998).

Microscópicamente las lesiones de LL en los órganos consisten en áreas multifocales coalescentes de células linfoides inmaduras extravasculares. Ocasionalmente puede detectarse una leucemia terminal. En la bolsa de Fabricio, un patrón folicular de crecimiento tumoral es una característica constante. Las células de estas neoplasias varían ligeramente de tamaño, con morfología linfoides, con citoplasma basófilico, con núcleo grande y patrón de cromatina reticular y nucleolos prominentes (Payne, 1993; 1997).

Otras presentaciones neoplásicas asociadas a infecciones con ALV son: eritroblastosis, mieloblastosis, mielocitomatosis, hemangiomas, nefroblastomas, adenocarcinomas, osteopetrosis y tumores de tejido conectivo (Arshad, 1997b; Payne, 1997).

### 3.2.6. DIAGNOSTICO

El diagnóstico de laboratorio puede involucrar estudios patológicos y virológicas. La identificación del tipo de neoplasia es realizada por examen macroscópico y microscópica de las lesiones. El estudio histopatológico es necesario, se recomienda el examen de: hígado, bazo, bolsa de Fabricio, timo, médula ósea, gónadas, nervios y tumores evidentes ( Fadly, 1997c).

La presencia de infección puede ser demostrada más fácilmente por detección de anticuerpos neutralizantes. La prueba de fijación de Complemento fue utilizada en forma extensiva, sin embargo con el desarrollo de la prueba de ELISA para detección de antígenos y anticuerpos la han colocado como la prueba idónea. También pueden utilizarse otras técnicas como la prueba de factor inductor de resistencia, pruebas inmunohistoquímicas, radioinmunoensayos y prueba de transcriptasa reversa (Benkel, 1998; Fadly, 1997c; Payne, 1998; Witter, 1997c).

La prueba de PCR ha demostrado ser más rápida, específica y sensible que las pruebas de diagnóstico convencionales para la detección de ALV y una buena opción para estudios epidemiológicos y programas de erradicación (Smith, 1998).

## 3.3. RETICULOENDOTELIOSIS

Estudios serológicos, indican que la infección con REV se encuentra ampliamente distribuida, pero debido a su carácter clínico esporádico, generalmente asociado a contaminación accidental de vacunas de virus vivo, su importancia económica solo ocurre en las parvadas afectadas y poco se ha realizado para lograr su control (Fadly, 1997a).

### 3.3.1. ETIOLOGÍA

Los virus de la Reticuloendoteliosis (REV), son un grupo de virus pertenecientes al grupo C de la familia *retroviridae*, relacionados con retrovirus de mamíferos y no relacionados antigénicamente al grupo Leucosis/sarcoma. Existen



virus altamente oncogénicos generalmente asociados a defectos en su replicación como la cepa REV-T, poseedor del oncogen transformante (*v-rel*) que producen proliferación de células primitivas mesenquimales o reticuloendoteliales, incluyendo linfocitos B y T. Por otro lado, las cepas de REV no defectivas que incluye y una cepa transformante (REV-A), virus sincitial del pollo (CSV), virus de la anemia infecciosa de los patos (DIAV), el virus de la necrosis esplénica (SNV) y otros aislamientos de aves; no presentan oncogenes en su genoma y dependiendo de la cepa pueden inducir retraso en el crecimiento con inmunosupresión, neoplasias agudas o linfomas similares a MD o ALV (Bagust, 1993; Fadly, 1997a; Witter, 1997a).

La cepa de referencia REV-T(REV-A), contiene un virus defectivo para replicación (rd) con características de altamente transformante y un virus no defectivo cooperador (nd) capaz de producir enfermedad inmunodepresiva, retraso en crecimiento y transformación celular. Las otras cepas no son defectivas y su capacidad tumorigénica aguda también esta ausente, con excepción de un aislamiento Australiano. Esto ha requerido una revaloración de las publicaciones anteriores sobre la enfermedad (Fadly, 1996; 1997b).

La mayoría de las cepas de REVnd pueden crecer en cultivos de fibroblastos de pollo, patos, pavos, codornices y faisanes, su efecto citopático puede variar con la cepa viral y el sustrato celular, su efecto es temporal y puede no ser aparente. Las técnicas para detección como inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa y PCR han sido necesarias para poner de manifiesto la replicación viral (Calvert, 1994; Fadly, 1997c).

### 3.3.2. EPIZOOTIOLOGIA

La infección natural de REV, ha sido reconocida en pollos pavos, patos, codornices y faisanes. Esta enfermedad es endémica en algunas parvadas de pavos, patos y gansos que constituyen un reservorio natural de la infección. Las parvadas de pollos incubados en sitios persistentemente infectados, puede tener una pequeña proporción de pollos virémicos y puede diseminarse al resto de la parvada por el uso de agujas de vacunación comunes y diseminación horizontal durante la primera semana de vida (Fadly, 1997a,b; Payne, 1998).

Las reproductoras persistentemente virémicas eliminan bajos niveles de virus y contaminan los embriones, aunque pueden ser seroneutralizados por los anticuerpos maternos. La transmisión horizontal puede ocurrir en los pollos jóvenes en contacto estrecho, las gallinas adultas exponen a los machos por compartir bebederos y por la copulación (Fadly, 1996; Kreager, 1998; McKay, 1998).

La resistencia a REV asociada a la edad, previene el desarrollo de viremia persistentes en pollos infectados después de la primer semana de edad, excepto cuando son infectados intraovo o los primeros días de edad (Fadly, 1996; 1997c).

En los pollos, la mayoría de las exposiciones de campo ocurren asintomáticas, probablemente como resultado de la resistencia del huésped a la edad de exposición. La exposición de pollos de un día de edad a una vacuna contaminada usualmente se asocia a REVrd produce mortalidad del 2 al 100%, una enfermedad severa caracterizada por desórdenes de la pluma, retraso del crecimiento, inmunodepresión durante los primeros meses de vida y tumores reticuloendoteliales en infecciones crónicas. Las pérdidas económicas por REV no han sido estimadas, incluyendo las pérdidas por productividad subóptima y la inmunosupresión que reduce la efectividad de los programas de inmunización y predispone a infecciones bacterianas y micóticas secundarias (Bagust, 1993; Payne, 1993; Fadly, 1997c; Weinstock, 1989).

### 3.3.3. PATOGENESIS

La infección por REV puede inducir tolerancia, viremia persistente o tolerancia parcial; los pollos no tolerantes producen anticuerpos humorales con duración de semanas o meses. La infección crónica induce el desarrollo de tumores linforeticulares en órganos viscerales e infiltración de nervios. El mecanismo de inducción de linfomas en pollos parece similar al de ALV (Fadly, 1996).

La edad del huésped a la exposición a REVnd es probablemente el principal factor influyendo la patogénesis, los pollos infectados al día de edad, manifiestan acumulación de partículas virales en las capas cilíndricas e intermedias del folículo de la pluma en desarrollo, acompañado de respuesta inflamatoria, degeneración, manifestado por un defecto en el desarrollo de la pluma. La inoculación al día 6-7 de

incubación produce una infección tolerante con viremia persistente, así mismo solo 2-10% inoculado al inmediatamente después del nacimiento (Bagust, 1993; Fadly, 1997c).

Los anticuerpos maternos pueden proteger pollos recién nacidos contra los efectos inmunosupresivos de REV(nd), reduciendo el nivel de infección, la duración de la viremia y son capaces de neutralizar niveles bajos de virus eliminados por huevo (Fadly, 1997a, b).

#### 3.3.4. SIGNOLOGÍA

Los pollos infectados embriónicamente o expuestos a REV (nd) o (rd) al nacimiento, se caracterizan por letargia antes de su muerte, los sobrevivientes de esta fase aguda, desarrollan, defectos en la pluma, anemia, retraso del crecimiento e infecciones secundarias alrededor de la 3 semana de edad, seguidos de muerte por tumores parecidos a los de MD, la diferencia entre cepas defectivas y no defectivas se manifiesta solo en la severidad de los signos y el tipo de neoplasia desarrollada (Fadly, 1996; Payne, 1998).

El defecto en el desarrollo de la pluma se ha denominado Nakanuke. El retraso en el crecimiento es consecuencia del daño causado por los cambios inflamatorios en el proventrículo e hígado. La inmunosupresión es causada por la replicación viral y daño inflamatorio en los órganos linfoides (Bagust, 1993; Fadly, 1997c).

#### 3.3.5. PATOLOGIA

Las lesiones macroscópicas en infecciones naturales y experimentales son similares en todas las especies. En la fase inicial se observa atrofia de bazo, bolsa de Fabricio y timo, hinchazón del proventrículo y defectos de la pluma, con evidencia de infecciones bacterianas secundarias. Es frecuente encontrar hepatomegalia y esplenomegalia con puntos grisáceos subcapsulares de tamaño variable. Los tumores de RE pueden presentarse en bazo, hígado, gónadas, riñones, a lo largo del tracto

digestivo entre el buche y ciego; ocasionalmente los nervios están agrandados, descoloridos y con pérdida de estriaciones (Fadly, 1997b, c; Payne, 1998).

Las lesiones microscópicas se caracterizan por lesiones hipoplásicas en bolsa de Fabricio, timo y bazo, con cambios hiperplásicos e inflamatorios en hígado y proventrículo. Células mononucleares alrededor de los vasos se encuentran en perineuro de nervios ciáticos y cerebro aunque por su carácter monoclonal de las células transformadas, puede ayudar a su diferenciación histopatológica. Los pollos jóvenes también presentan anemia y leucopenia, así como cambios degenerativos e inflamatorios en las capas intermedias y cilíndricas de las plumas (Barth, 1990; Fadly, 1997b, c; Payne, 1998; Witter, 1989; 1997b).

Una gran variación de tumores se han descrito en pollos y patos, incluyendo linfomas, linfosarcomas, sarcomas histiocíticos y de células fusiformes, carcinomas de células escamosas y adenocarcinomas. Las enfermedades linfomatosas están asociadas a virus no defectivos y se caracterizan por células B productoras de IgM o por células T que afectan varios órganos, pero no la bolsa de Fabricio. Al examen de tumores producidos por la cepa REV-T, se observa un 95% de positividad a IgM y los datos indican que los tumores IgM negativos, se originan de células T o líneas celulares mieloides, pudiendo coexistir ambos tipos de células en la misma ave (Barth, 1990; Fadly, 1997b; Payne, 1998).

### 3.3.6. DIAGNOSTICO

El examen patológico por si solo no es suficiente para establecer el diagnóstico de RE y debe ser respaldado por estudios serológicos o virológicos. Pruebas de ELISA, Inmunofluorescencia y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han sido desarrolladas para detección de REV (Davidson, 1995; Kokuuslu, 1989; Pizarro, 1992).

### 3.4. INMUNOHISTOQUÍMICA

El procesamiento de muestras fijadas en formalina amortiguada, ha sido utilizado durante muchos años, permitiendo el desarrollo de áreas en el estudio de la medicina, sin embargo, con el desarrollo de técnicas inmunohistoquímicas que permiten la identificación específica de los agentes causantes de las lesiones y la caracterización molecular de los componentes celulares, los resultados no pueden quedar en la descripción y el diagnóstico de los cambios anatómicos asociables a determinadas enfermedades (Nadji, 1986).

Los fijadores utilizados en la preservación de las muestras, pueden afectar la identificación inmunohistoquímica de los antígenos específicos en los bloques de parafina archivados durante largos períodos, actualmente el uso de formalina amortiguada es una opción poco utilizada, prefiriendo soluciones ácidas o amortiguada con zinc (Nadji, 1986; Arnold, 1996).

La expresión de antígenos es complicada por la variante estabilidad del antígeno, sensibilidad y especificidad del anticuerpo y la interpretación de la tinción. La reexposición de antígenos en los tejidos preservados, se ha realizado por la degradación enzimática con soluciones de tripsina, con resultados variables, dependiendo del antígeno. Recientemente, el uso de temperaturas elevadas en soluciones de citratos o EDTA, ha permitido una mejor reactivación de los antígenos, mediante la liberación de iones de calcio ligados a las proteínas durante el procesamiento de fijación en formalina (Taylor, 1996).

#### 4.0. MATERIAL Y MÉTODOS

**Muestras.-** Se utilizaron muestras de diversos órganos procedentes de parvadas reproductoras y posturas comerciales, constituyendo 82 casos con diagnóstico de tumores linfoides, obtenidos de laboratorios localizados en diferentes áreas geográficas, cuya cobertura incluyen los estados del norte, noroeste, centro y sureste del país. Por razones económicas no se permitió mencionar las estirpes y nombres de las empresas involucradas. Se formaron dos grupos considerando los diagnósticos histopatológicos de enfermedad de Marek y Leucosis aviar, realizados previamente por los patólogos responsables en los laboratorios que proporcionaron las muestras. El grupo de leucosis aviar se constituyó por 30 casos y el grupo con diagnóstico de enfermedad de Marek por 20 casos.

**Histopatología.-** Todos los tejidos tuvieron historia de haber sido preservados por inmersión en formalina amortiguada al 10%, aunque debido a la recolección de muestras por médicos clínicos, es posible no sea real. El procesamiento común empleado incluyó la inclusión en parafina. Se realizaron cortes a 4  $\mu\text{m}$  de grosor y teñidas con hematoxilina-eosina. Se examinaron en un microscopio óptico, describiendo las características de las lesiones, con base en los criterios establecidos previamente (Valero, 1997; Prophet, 1992).

**Inmunohistoquímica.-** El procesamiento para la técnica de inmunoperoxidasa utilizó un equipo de reactivos Histostain-SP de Zymed Laboratories<sup>1</sup>, siguiendo el <sup>1</sup>procedimiento recomendado, pero alargando algunos tiempos de incubación, se seccionaron los tejidos a 4  $\mu\text{m}$  de grosor y fueron adheridos en portaobjetos previamente preparados con una solución de poly L-lisina al 0.1% mediante la inmersión durante 24 horas y secado al aire y preservados en refrigeración hasta su uso. La prueba requirió el desparafinado de los cortes en dos soluciones de xilol y

---

<sup>1</sup> ZYMED Laboratories INC.  
458 Carlton Court. South San Francisco  
Ca 94080

rehidratado en series gradientes de etanol, manteniéndolas en solución amortiguada de fosfatos (pH 7.4) por al menos 20 minutos. Seguidamente los cortes fueron inmersos en una solución de peróxido de hidrógeno al 30% en alcohol metano absoluto (a proporción 1:10) durante al menos 20 minutos para eliminar la actividad de las peroxidasas endógenas propias de los tejidos. Para la re-exposición de antígenos, se emplearon dos tratamientos independientes: el primero consistió en la aplicación de una solución de tripsina al 0.1% en cloruro de calcio (pH 7.8) a temperatura de 42C durante 20 minutos, el otro tratamiento fue el calentamiento de los cortes histológicos en un microondas a temperatura máxima por 2 periodos de 5 minutos en una solución de citrato de sodio (pH 7.8). Enseguida, se aplicó una solución bloqueadora de los factores inespecíficos en el suero ( suero no inmune de cabra) incluida en el equipo comercial durante al menos 20 minutos y sin lavar, los anticuerpos primarios se aplicaron durante al menos 3 horas, y en algunos casos durante toda la noche, incubado en cámara húmeda. El anticuerpo secundario biotinizado se mantuvo durante al menos 20 minutos. Se utilizó amino-ethylcarbazol (AEC) como sustrato cromógeno. Finalmente fueron contrateñidos mediante la aplicación de dos gotas de hematoxilina durante 7 minutos, lavado en agua destilada y 30 segundos en solución de fosfatos enjuague en agua destilada y montados con Histomount.

**Anticuerpos.-** Se utilizaron anticuerpos monoclonales contra la glicoproteína 62 de REV, glicoproteína 85 de ALV, y MATSA como indicativos de infección viral específica que fueran proporcionados gentilmente por el Dr. Lucy F. Lee (Avian Disease and Oncology Laboratory, East Lansing, Michigan). Para determinación de tipos celulares linfocíticos se utilizaron anticuerpos monoclonales contra IgM para caracterizar Linfocitos B y anticuerpos contra antígenos CD4 y CD8 para identificar las poblaciones de linfocitos T, los cuales fueron adquiridos de Southern<sup>2</sup> Biotechnology Associates Inc.<sup>2</sup>. Los controles positivos para los antígenos asociados con infección viral se establecieron con el centrifugado de una vacuna comercial

---

<sup>2</sup> Southern Biotechnology Associates Inc.  
Birmingham, AL 325226, USA.

asociada a células de la cepa HVT, un corte de muestra neoplásica linfoide en hígado, resultante positiva a antígenos de leucosis aviar mediante una prueba de ELISA y una muestra de tumor linfoide positiva a REV y negativa a AL y a MDV mediante la prueba de ELISA. Los controles para los anticuerpos monoclonales de linfocitos B y T, fueron cortes de bolsa de Fabricio, timo y bazo de una ave sana de 5 semanas.

**Diseño Estadístico.-** Se recolectó el máximo total de muestras accesible en los laboratorios del país. La estimación de diferencias significantes entre tratamiento se evaluó por el coeficiente de concordancia de Kappa, definiendo como prueba control el diagnóstico histopatológico. Se utilizó el programa Win episco 2.0 de la Universidad de Zaragoza.

### **Preparación de reactivos**

La solución de tripsina al 0.1%, consistió en 1 gramo de tripsina en una solución de CaCl al 0.1% (pH 7.8). La solución de citratos para el tratamiento de re-exposición de antígenos por calor, correspondió a soluciones de ácido cítrico y citrato de sodio en alcohol metílico al 25 %. Los anticuerpos monoclonales fueron probados a diluciones de 1: 100, 1: 200, 1:400 y 1:800, se decidió utilizar la dilución 1:400 para todos, en una solución amortiguada de fosfatos 0.1 M (pH 7.4). Las soluciones de lavado consistieron en soluciones de fosfatos 0.1 M (pH 7.6) (Valero, 1997).



## 5.0. RESULTADOS

Se seleccionaron 50/82 casos, constituyéndose un grupo de 30 casos con diagnóstico de Leucosis linfoide y un grupo de 20 casos con diagnóstico de enfermedad de Marek. Los criterios de exclusión fueron: muestras con un período de almacenamiento mayor de 2 años (12/82), casos con diagnóstico de leucosis aviar que correspondieron a leucosis mielóide (14/82) y/o cambios autolíticos avanzados 6/82.

Se utilizaron 2 métodos para la exposición de antígenos: uno basado en el efecto enzimático de la tripsina a diferentes temperaturas, por un período de 10 minutos, se obtuvieron los mejores resultados a 42C, encontrando que temperaturas elevadas provocan mucha pérdida de tejido por desprendimiento. Otra la técnica de recuperación de antígenos mediante la aplicación de altas temperaturas a las secciones adheridas en portaobjetos, introduciéndolos en horno de microondas a temperatura máxima por 2 periodos de 5 minutos en soluciones de citrato de sodio, demostraron una mayor capacidad de restitución de antigenicidad en las muestras procesadas.

Con relación al desarrollo de la prueba debido a la naturaleza variada de los tejidos incluidos en este trabajo, la inactivación de las peroxidasas endógenas mostró problemas con la presentación de reactividad inespecífica sobre todo el tejido, cuando se utilizó solo 10 minutos de incubación, la ampliación del periodo de incubación a 20 minutos corrigió el problema. El bloqueo de los factores inespecíficos del suero se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. Para evitar los problemas inherentes a la especificidad de los anticuerpos, se utilizaron solo anticuerpos monoclonales, probando diluciones de 1: 100, 1: 200, 1:400 y 1:800 para la titulación de la actividad óptima en la identificación de los antígenos específicos. A pesar que todas las diluciones mostraron capacidad de identificación, se decidió utilizar la dilución 1:400 para todos los anticuerpos

### Enfermedad de Marek

Con relación a los casos diagnosticados como Enfermedad de Marek, las principales muestras incluidas correspondieron a: nervios en 18/20 casos; bazo en 18/

20 casos; bolsa de Fabricio en 13/20 casos; corazón en 8/20 casos; proventrículo en 6/20 casos; cerebro en 4/20 casos; timo en 6/20 casos; intestino en 5/20 casos.

Debido a la poca uniformidad en los criterios para la recolección de los órganos proporcionados para el estudio con relación a los casos de enfermedad de Marek, los nervios, el bazo y la bolsa de Fabricio son los que mejor permiten analizarlos.

Los resultados histopatológicos de los casos diagnosticados como enfermedad de Marek, se caracterizaron por infiltrado de células reticulares, linfocitos grandes y pequeños, así como cambios degenerativos en los diferentes órganos. En los cortes de nervios se presentaron lesiones infiltrativas del tipo A en 4/18 muestras (fig.1); infiltrado tipo B en 12/18 muestras y tipo C en 2/18 muestras. Las lesiones en bazo se caracterizaron por una depleción linfoide moderada con hiperplasia reticuloendotelial de moderada a severa, encontrándose en 2/18 casos (fig.2, fig.3), múltiples focos bien delimitados de proliferación celular, compuesta por linfocitos inmaduros con patrón monomórfico (fig.4); los cortes de bolsa de Fabricio mostraron atrofia folicular de moderada a severa con fibrosis intersticial moderada, formación de pliegues en el epitelio lineal en 9 / 13 casos. Se detectó la presencia de *Cryptosporidium* sp. adherido al epitelio lineal con una respuesta inflamatoria por heterófilos en 2/11 cortes. Las muestras de miocardio, mostraron infiltrado tipo A en 2/8 casos, aunado a atrofia y separación de fibras musculares (fig.5). 2/6 muestras de proventrículo presentaron un infiltrado linfocítico y reticuloendotelial moderado, afectando su capa glandular, así como nódulos bien delimitados, caracterizados por células linfoides inmaduras, con patrón celular monomórfico y basofilia moderada en 1/6 casos (fig.6). Infiltración linfocítica perivascular y microgliosis ligera se encontraron en 3/4 muestras de cerebro. Los cortes de timo presentaron atrofia moderada con hemorragias ligeras en 5/6 casos; 2 cortes de intestino mostraron una severa hiperplasia linfoide submucosa de distribución difusa, no delimitada.

Las pruebas inmunohistoquímica de los casos diagnosticados como enfermedad de Marek, mostraron reactividad al antígeno MATSA en 19/20 casos (fig.15), aunque con una distribución escasa en el infiltrado. 2/20 casos mostraron células con positividad a los antígenos de ALV. Las poblaciones predominantes

correspondieron a linfocitos CD4 en 20/20 casos (fig.12), con presencia de escasos linfocitos CD8. También se detectaron linfocitos IgM en 6/11 casos, pero no correspondiendo a células transformadas, posiblemente correspondan a linfocitos circulantes.

### Leucosis linfoide

Las principales muestras presentadas en los casos diagnosticados como leucosis linfoide correspondieron a hígado en 30/30 casos, bazo en 29/30 casos, riñón en 26/30 casos, intestino en 4/30 casos, bolsa de Fabricio en solo 1/30 casos. Es importante remarcar la poca inclusión de muestras de bolsa de Fabricio, pieza importante en el criterio histopatológico para el diagnóstico de leucosis aviar. Esta distribución de muestras se debe a que la mayoría de las muestras fueron recolectadas por los médicos supervisores y remitidas a los laboratorios para su estudio.

Los resultados histopatológicos para Leucosis linfoide consistió en una proliferación celular caracterizada por un patrón infiltrativo no delimitado con distribución perivascular, ocupando una distribución perivascular en cortes de hígado (fig.7) y riñón (fig.8). Las características celulares consistieron en células de núcleo redondo a oval, central, escaso citoplasma, nucleolo prominente, cromatina reticular y cantidad moderada de mitosis (fig.11). Sin embargo, en 3/30 casos las características celulares muestran una población linfoide con marcado pleomorfismo, abundantes mitosis, núcleos grandes con cromatina perinuclear y nucleolos aparentes (fig.10).

Los resultados inmunohistoquímicos de las muestras diagnosticadas como Leucosis linfoide, indican que las células transformadas en 30 / 30 casos, mostraron reactividad para la presencia de antígenos del virus de Leucosis aviar (fig.14); en 27 / 30 casos se identificaron antígenos contra IgM (fig.16), correspondiendo a linfocitos B; 3/30 casos, correspondientes a las muestras con población celular de pleomorfismo nuclear, no marcaron con ninguno de los anticuerpos de identificación celular, indicando que no pertenecen a linfocitos B y T. Los antígenos del virus de Leucosis aviar se localizaron en las células transformadas, además en células no transformadas alrededor de arteriolas en bazo.

## Estadística

Comparando las técnicas diagnósticas para el diagnóstico de Marek, mediante la prueba de concordancia de Kappa, se muestra una concordancia de 1.00 para la presencia del antígeno MATSA. Sin embargo, los criterios diagnósticos para determinar una presentación visceral de la infección por MDV, presentan una marcada deficiencia, debido que solo 2 / 9 casos diagnosticados como Marek visceral, presentaron las características descritas por la literatura.

El análisis estadístico para comparar los diagnósticos histopatológicos, con la determinación de antígenos de ALV, mostró una concordancia de 0.621, que corresponde a una mala concordancia, con relación al tipo celular involucrado en la neoplasia.

## 6.0. DISCUSIÓN

El estudio de muestras archivadas en bloques de parafina para evaluar los marcadores celulares y de agentes infecciosos se ha hecho frecuente en el desarrollo de la patología, demostrando la epidemiología de algunas enfermedades y confirmando previos estudios histopatológicos. La evaluación de la expresión de los antígenos es complicada por la variabilidad del antígeno, la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos empleados y la interpretación de las tinciones inmunohistoquímicas (Dapson, 1993)

Los fijadores utilizados antes del proceso de inclusión en parafina, pueden afectar la identificación inmunohistoquímica de antígenos específicos. La solución de formol al 10% neutro amortiguado, ha sido el fijador de rutina por varias décadas, sin embargo, el desarrollo de nuevas tecnologías, lo han convertido en poco práctico. La reducción en el reconocimiento de antígenos por métodos inmunohistoquímicos es afectada por las ligaduras que se producen, sin embargo, estos cambios pueden ser revertidos por técnicas para recuperación de antígenos. En este trabajo, el uso del método de recuperación de antígenos mediante el uso de altas temperaturas, mostró mejor calidad en la exposición de antígenos que el tratamiento enzimático, estos resultados concuerdan con lo publicado, que demostró que la separación de los iones de calcio de los antígenos tratados con fijadores como la formalina amortiguada es mejor que el tratamiento enzimático (Taylor, 1996).

La prueba de inmunoperoxidasa, ha sido utilizada para el diagnóstico de Leucosis aviar en cultivos celulares, mostrando menor capacidad que la prueba de inmunofluorescencia y ELISA, estos resultados se explican por el uso de anticuerpos policlonales en ese estudio, sin embargo, es la mejor opción para el estudio retrospectivo de casos incluidos en bloques de parafina, donde no pueden ser utilizadas las otras técnicas (Nicholas, 1984).

Para el estudio de la enfermedad de Marek, también ha sido utilizada la prueba de inmunoperoxidasa en cultivos celulares, mostrando ser un método rápido y sensible para cuantificar la replicación viral. Sin embargo, poco se ha aplicado al análisis de muestras histopatológicas (Silva, 1997).

En la búsqueda de casos diagnosticados como neoplasias linfoides en los principales laboratorios del país, solo se recolectaron 82 casos, debido a que muchos laboratorios desechan los bloques de parafina, perdiendo valiosa información para futuros estudios. Por otro lado, otros laboratorios no proporcionaron las muestras solicitados debido a su condición de exclusividad para alguna compañía, cuya política impide la difusión de los resultados internos.

Los resultados histopatológicos de los casos de enfermedad de Marek, mostraron las características microscópicas descritas por Payne, 1997, principalmente de su presentación clásica, sin embargo, los diagnósticos histopatológicos previos muestran diferencias en los criterios personales de los diferentes patólogos en los laboratorios participantes. La presencia de nódulos linfoides bien delimitados con un patrón monomórfico en los cortes de bazo y proventrículo se ha asociado a la formación de focos de proliferación preneoplásica, por cepas con poca actividad oncogénica de Leucosis aviar, lo cual es corroborado por la detección de antígenos del virus de Leucosis en la prueba de inmunoperoxidasa, estos cambios son predispuestos por la presencia de virus de la enfermedad de Marek que proporcionan mayor cantidad de células activadas susceptibles a la transformación. Estos hallazgos son más frecuentes en las estirpes comerciales que presentan inmunotolerancia y son detectables por la semana 14 de edad ( Bagust, 1993; Payne, 1997).

La presencia de Criptosporidiasis bursal, parasitosis asociada a estados inmunosupresivos en las aves, indica el efecto de la replicación viral en la respuesta celular de organismo. Sin embargo, esta parasitosis ha demostrado capacidad para causar la involución prematura de la bolsa de Fabricio. La inmunodepresión también puede ser estimada en el grado de la atrofia tímica, teniendo la edad referente del ave (Calnek, 1998; Schat, 1991).

Con relación a los resultados inmunohistoquímicos, la detección de antígenos MATSA en la mayoría de los cortes, corrobora lo publicado por McFerran que este antígeno es el blanco para las células con transformación neoplásica, sin embargo, la destrucción de este antígeno no afecta las reacciones citotóxicas, debido que también se han determinado otros antígenos blanco como el complejo principal de histocompatibilidad (Bagust, 1993).

El dominio de las poblaciones CD4+ en las células transformadas, determina que es la población blanco para transformación y se explica por la alta proporción de apoptosis en los linfocitos CD8+. Aunque no tiene la exclusividad pues se han encontrado linfocitos B o todas las combinaciones de poblaciones de linfocitos TCD4-, CD4+, CD8- y CD8+ (Calnek, 1998; Payne, 1998; Schat, 1991).

En la comparación de las técnicas diagnósticas para Marek, encontramos alta concordancia en los patrones virales y celulares, sin embargo, no permiten establecer el grado de patogenicidad de las cepas involucradas, debido que no hay antígenos demostrables asociados con la capacidad patogénica de las cepas de MDV requiriendo los estudios histopatológicos como clave para determinarlo, dependiendo de la distribución y grado de las lesiones que produzca determinada cepa viral. Se ha establecido que el grado de inmunosupresión desarrollado por las cepas después de la segunda semana de edad de los pollos, tiene correlación con su grado de patogenicidad y puede establecerse como parámetro para clasificación de nuevas variantes patogénicas. El encontrar pocos problemas en relación con los métodos inmunohistoquímicos para detección de infección por MDV, sucede debido a la ausencia de evidencia de infección con el virus de RE (Kreager, 1998; Davidson, 1998).

Las características de las neoplasias linfoides asociadas al virus de leucosis, se describen con patrones de crecimiento infiltrativos y nodulaciones bien delimitadas, con características celulares de núcleos de cromatina condensada, nucleolo aparente, citoplasma escaso y basofílico, características que muestran las neoplasias examinadas. Sin embargo, en este estudio las lesiones encontradas son de patrón infiltrativo, que se asocian mas con cepas de ALV de baja oncogenicidad (Payne, 1993; 1998).

La detección de antígenos virales de Leucosis aviar en todos los casos diagnosticados, no determina el origen de las neoplasias. Por otro lado, la presencia de los antígenos IgM que determinan una población de linfocitos B, en ausencia de antígenos del virus de la reticuloendoteliosis, si permiten establecer esta enfermedad. La no-localización de antígenos IgM en 3 casos positivos a la presencia de antígenos virales, no descarta una presentación de leucosis aviar, solo que no corresponde a

leucosis linfoide debido que no solo los linfocitos B son su blanco de transformación neoplásica (Payne, 1993).



## 7.0. CONCLUSIONES

La demostración de la presencia del virus de la Reticuloendoteliosis de las aves en estas muestras no fue posible, pudiendo establecerse que este virus no está involucrado en forma significativa en los problemas linfoproliferativos de las gallinas comerciales en nuestro país

La caracterización histopatológica de las lesiones linfoproliferativas de las gallinas, muestran pocas diferencias con las descritas en la literatura, sin embargo la baja concordancia de la prueba usada comúnmente ( histopatología) con las pruebas inmunohistoquímicas, indica que es necesario la confirmación de los diagnósticos en los laboratorios distribuidos en nuestro país.

Por otro lado, los criterios histopatológicos para establecer los diagnósticos de la presentación visceral de la Enfermedad de Marek, deben ser revisados entre los patólogos veterinarios involucrados en el diagnóstico de las enfermedades de las aves, debido que la mayoría de los casos diagnosticados como presentación visceral, correspondieron a su presentación clásica.

Con relación a las técnicas inmunohistoquímicas, en los casos de Leucosis linfoide, debido a la ausencia de evidencia de infección por REV, las técnicas de diagnóstico basadas en detección de antígenos asociados a los virus y detección de antígenos celulares, mostraron excelente concordancia, indicando que ambos procedimientos son correctos. El uso de la combinación de ambas técnicas es la mejor elección.

Como se ha descrito en la literatura, los tipos celulares transformados por el virus de Leucosis aviar, correspondieron a linfocitos B, positivos a los marcadores de IgM, no mostrando diferencias significativas. En los casos de la enfermedad de Marek, los linfocitos predominantemente transformados, correspondieron a linfocitos T, indicado por reactividad a los anticuerpos contra los marcadores CD4.

El uso de anticuerpos contra el antígeno MATSA, así como contra marcadores linfocíticos, especialmente antígenos CD4, mostraron buenos resultados para el diagnóstico de Marek y en ausencia de antígenos contra REV, son suficientes para demostrar la infección por MDV.

Es importante indicar que no hay publicaciones sobre el uso de altas temperaturas en la recuperación de antígenos de Leucosis aviar o Enfermedad de Marek en bloques de parafina con periodos prolongados de almacenamiento.



Figura 1. Enfermedad de Marek, presentación clásica, corte de nervio con infiltrado linfocítico focal (100X), H&E

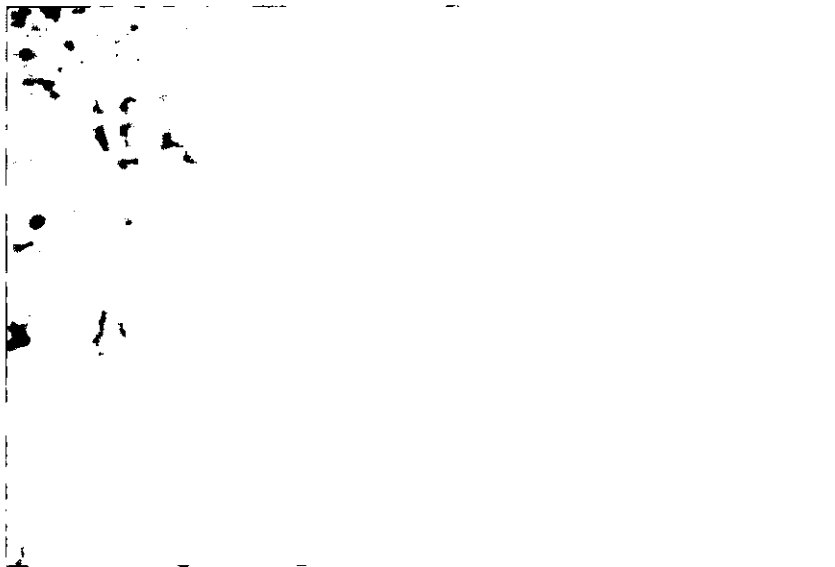


Figura 2. Enfermedad de Marek, corte de bazo con hiperplasia de células reticuloendoteliales severa (40X), H&E.

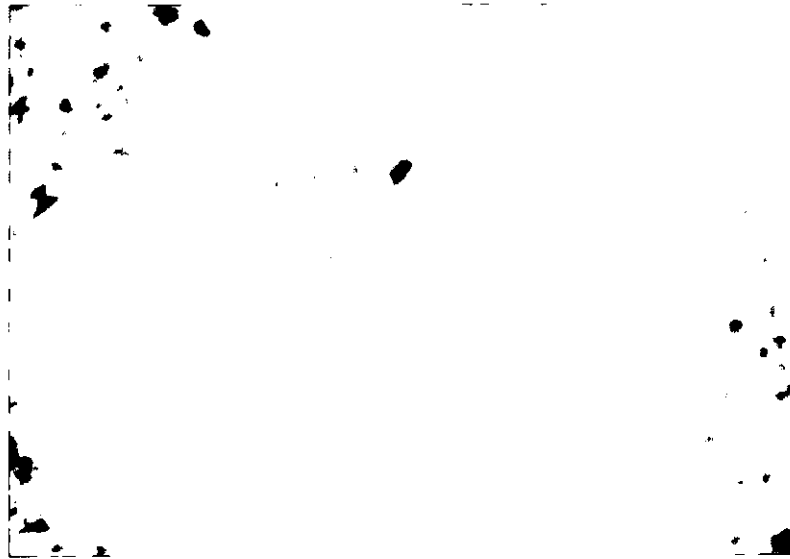


Figura 3. Enfermedad de Marek, corte de bazo con hiperplasia de células reticuloendoteliales y un nódulo bien delimitado, basofílico, con ligero monomorfismo celular, denominado nódulo preneoplásico

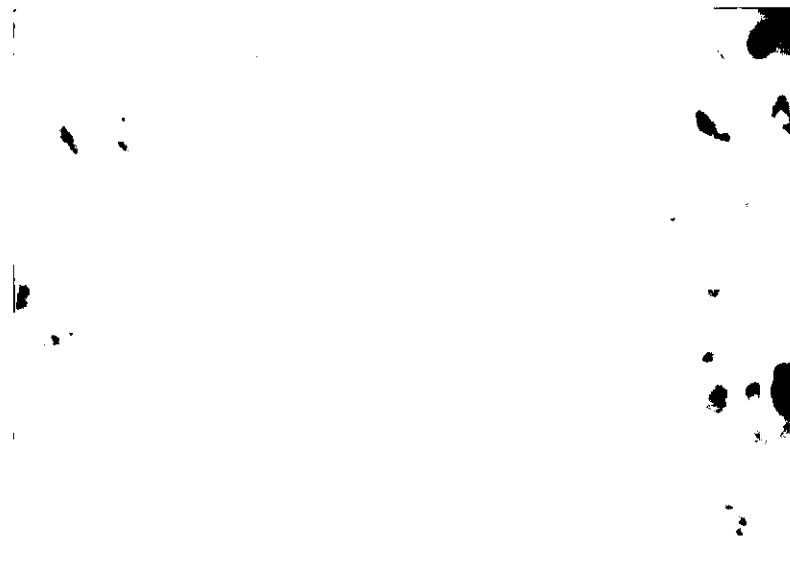


Figura 4. Enfermedad de Marek, corte de miocardio con infiltrado de células reticuloendoteliales y escasos linfocitos, lesión clasificada como infiltrado tipo B (100X), H&E



Figura 5. Enfermedad de Marek, corte de proventrículo con nódulo linfoide bien delimitado en su capa glandular, mostrando un patrón celular monomórfico (40X), H&E



Figura 6. Enfermedad de Marek, corte de bazo con abundantes células linfoides positivas a antígenos MATSA, distribuidos en su membrana celular (40X), inmunoperoxidasa.



Figura 7. Enfermedad de Marek, corte de bazo con abundantes células reactivas a los anticuerpos contra antígenos CD4, mediante la prueba de inmunoperoxidasa (400X),

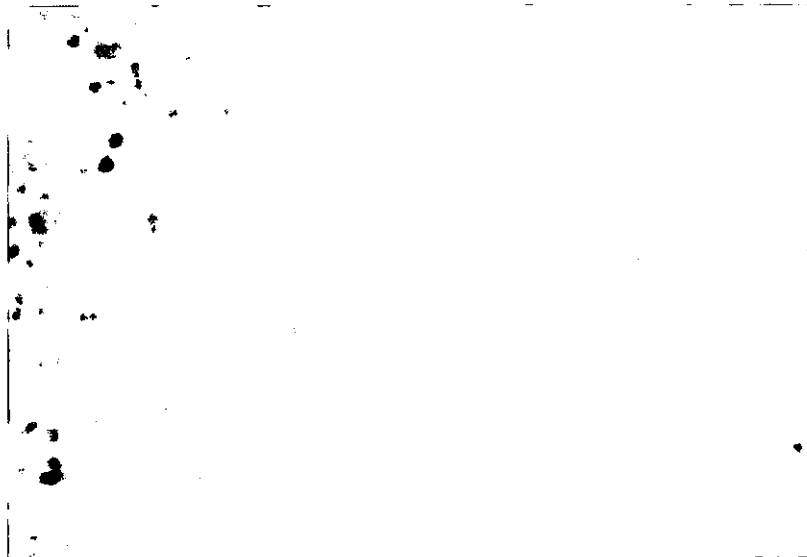


Figura 8. Leucosis linfoide, corte de hígado con infiltrado linfocítico abundante, con un patrón infiltrativo, desplazando los sinusoides hepáticos (40X), H&E.



Figura 9. Leucosis linfoide, corte de riñón con infiltrado linfocítico severo con un patrón celular monomórfico y basofílico (100X), H&E.

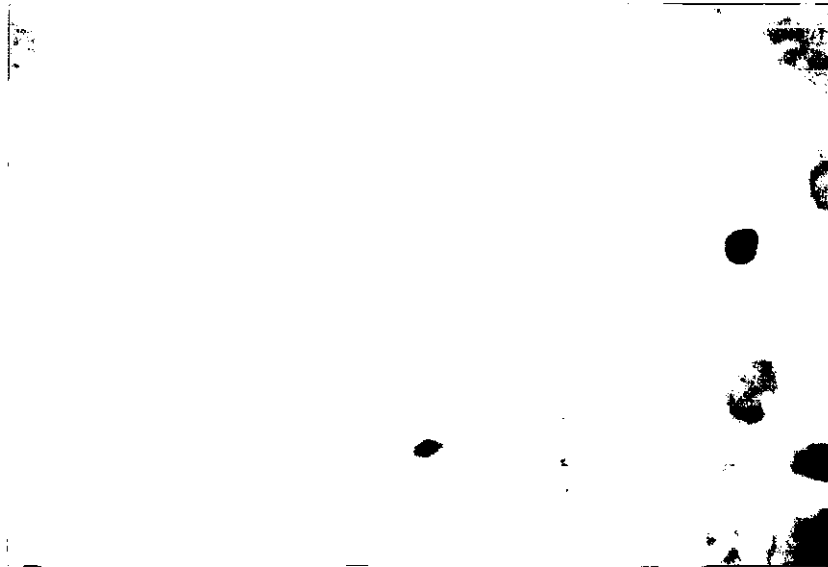


Figura 10. Leucosis linfoide, corte de hígado con presencia de células linfoides con un patrón celular monomórfico (400X), H&E.

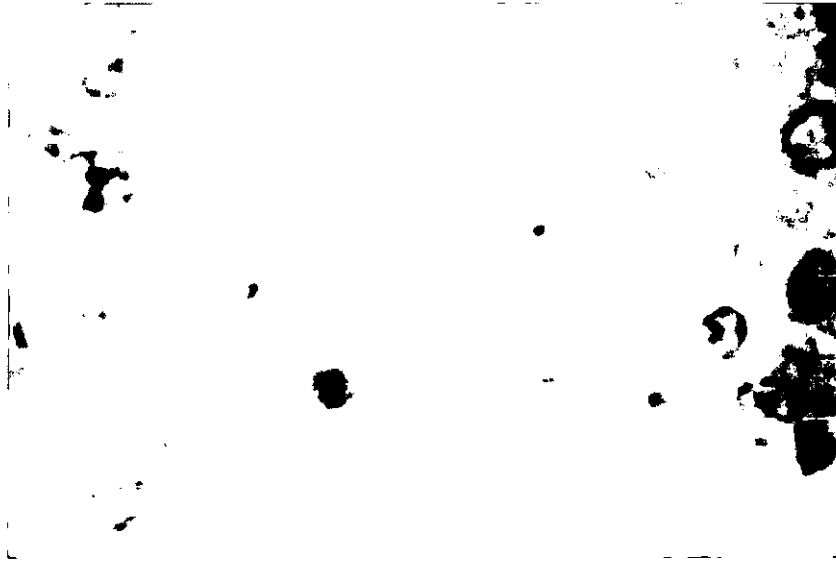


Figura 11. Leucosis linfoide, corte de hígado con infiltrado de células con un patrón nuclear pleomórfico, cromatina condensada y nucleolos aparentes (100X), H&E.



Figura 12. Leucosis linfoide, corte de neoplasia en serosa intestinal caracterizada por células positivas a la presencia de antígenos de ALV, mediante la prueba de inmunoperoxidasa (400X).



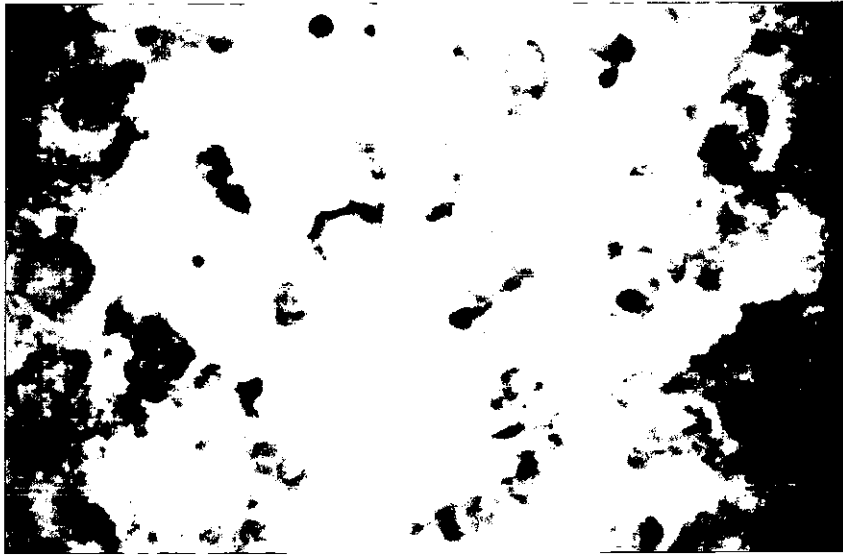


Figura 13. Leucosis linfoide, corte de hígado con células neoplásicas linfoblásticas positivas a la presencia de antígenos IgM, mediante la prueba de inmunoperoxidasa (400X).

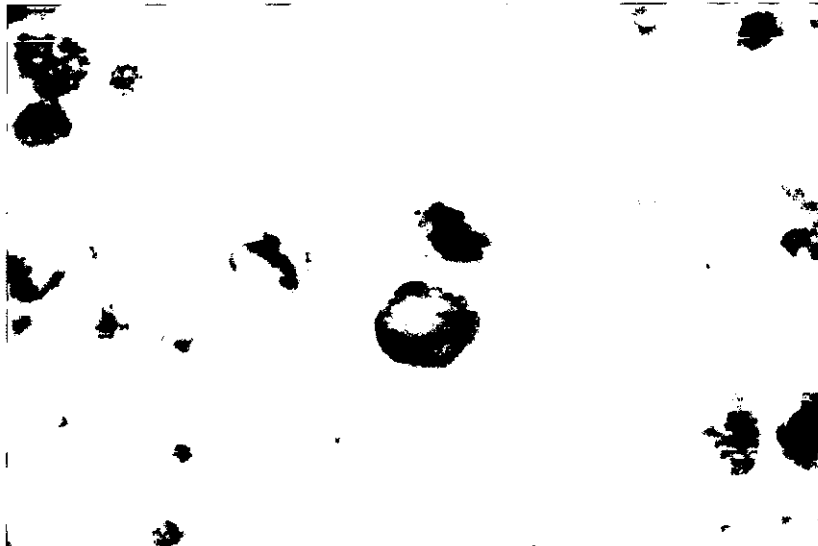


Figura 14. Leucosis linfoide, corte de hígado con infiltrado linfocítico de células positivas al antígeno IgM, mediante la prueba de inmunoperoxidasa (400X).

## 8.0 LITERATURA CITADA

1. Arnold M.M, Srivastava S, Freedenburgh J, Stockard CR, Myers RB and Grizzle W. Effects of fixation and tissue processing on immunohistochemical demonstration of specific antigens. *Biotechnic & Histochemistry*, 1996; 71: 224-230.
- 2.- Arshad SS, Bland AP, Hacker SM, Payne LN. A low incidence of histiocytic sarcomatosis associated with infection of chickens with the HPRS-103 strain of subgroup J avian leukosis virus. *Avian Dis* 1997a; 41: 947-956.
- 3.- Arshad SS, Howes K, Barron GS, Smith LM, Russell PH, Payne LN. Tissue tropism of the HPRS-103 strain of J subgroup avian leukosis virus and of a derivative acutely transforming virus. *Vet Pathol* 1997b; 34: 127-37.
- 4.- Bagust TJ. Reticuloendotheliosis virus in: *Virus infections of birds*. McFerran JB, McNulty MS. Elsevier Science publishers B.V.,1993; 29: 437-475.
- 5.- Barth FC, Ewert LD; Olson CW and Humphries HE. Reticuloendotheliosis virus REV-T (REV-A)- Induced neoplasia: Development of Tumors within the T-Lymphoid and Myeloid Lineages. *Journal of Virology* 1990; 64: 6054-6062.
- 6.- Benkel BF. Locus-specific diagnostic tests for endogenous avian leukosis-type viral loci in chickens. *Poult Sci* 1998; 77: 1027-1035.
- 7.- Biggs PM. The Leeuwenhoek Lecture, 1997. Marek's disease herpesvirus: oncogenesis and prevention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1997; 29: 1951-1962.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

- 8.- Calnek B.W.. Lymphomagenesis in Marek's disease. *Avian Pathology* 1998a; 27: S54-S64.
- 9.- Calnek BW, Harris RW, Buscaglia C, Schat KA, Lucio B. Relationship between the immunosuppressive potential and the pathotype of Marek's disease virus isolates. *Avian Dis* 1998b; 42: 124-132.
- 10.- Calvert JG; Nazerian K. An immunoperoxidase plaque assay for Reticuloendotheliosis virus and its application to a sensitive serum neutralization assay. *Avian Diseases* 1994; 38: 165-171.
- 11.- Cui Z, Lee L., Silva RF and Witter R L. Monoclonal antibodies against Avian reticulo-endotheliosis virus: Identification of strain-specific and strain-common epitopes. *Journal of Immunology* 1986; 136: 4237-4242.
- 12.- Darcel C. Lymphoid leukosis viruses, their recognition as 'persistent' viruses and comparisons with certain other retroviruses of veterinary importance. *Vet Res Commun* 1996; 20: 83-108.
- 13.- Davidson I, Smith E J, Perl S and Malkinson M. Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of natural infection of chickens and turkeys with avian oncogenic virus. *Israel Journal of Veterinary Medicine* 1995; 50: 97-104.
- 14.- Davidson I, Smith E J, Perl S and Malkinson M. A 4-year survey of avian oncogenic viruses in tumours-bearing flocks in Israel- a comparison of PCR serology and histopathology. *Avian Pathology* 1998; 27: S90.

- 15.- Fadly A M , Witter R L , Smith E J , Silva R F, Reed W M , Hoerr FJ and Putnam MR. An outbreak of lymphomas in commercial broiler breeder chickens vaccinated with a fowlpox vaccine contaminated with Reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathology* 1996; 25: 35-47.
- 16.- Fadly A M and Witter R L. Comparative evaluation of in vitro and in vivo assays for the detection of Reticuloendotheliosis virus as a contaminant in a live virus vaccine of poultry. *Avian Diseases* 1997a; 47: 695-701.
- 17.- Fadly AM, Smith EJ. Role of contact and genetic transmission of endogenous virus-21 in the susceptibility of chickens to avian leukosis virus infection and tumors. *Poult Sci* 1997b; 76: 968-73.
- 18.- Fadly A M, Avian retroviruses. *Veterinary Clinics of North America: Food animal practice* 1997c; 13: 71-85.
- 19.- Gong M, Semus HL, Bird KJ, Stramer BJ, Ruddell A. Differential selection of cells with proviral c-myc and c-erbB integrations after avian leukosis virus infection.. *J Virol* 1998; 72: 5517-25.
- 20.- Gorbovitskaia M, Covill  JL, Tixier-Boichard M. Molecular characterization of endogenous viral genes of the avian leukosis virus family in an experimental population of brown-egg layers. *Poult Sci* 1998; 77: 605-14.
- 21.- Kreager K.S.. Chicken industry strategies for control of tumor virus infections. *Poult. Sci* 1998; 77: 1213-1216.

- 22.- Kokuuslu C, Ozkul IA and Alcigir G. Comparison of the results of histopathological examination and the immunofluorescent antibody technique in the differential diagnosis of lymphoid leukosis(LL), Reticuloendotheliosis (RE) and Marek's disease (MD) in chickens. *Doga-Turk-Veterinerlik-ve-Hayvancilik-Dergisi* 1989; 13: 180-190.
- 23.- McKay, J.C. A poultry breeder's approach to avian neoplasia. *Avian Pathology* 1998; 27 : S74-S77.
- 24.- Marsh JD, Bacon LD, Fadly AM.. Effect of serotype 2 and 3 Marek's disease vaccines on the development of avian leukosis virus-induced pre-neoplastic bursal follicles. *Avian Dis* 1995; 39: 743-51.
- 25.- 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* 1998; 60: 1-8.
- 26.- Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase techniques: A practical approach to tumour diagnosis. American Society of Clinical Pathologists. 1986.
- 27.- Nicholas RAJ, Thorton DH. Detection of avian leukosis virus: Comparison of five techniques. *Research in Veterinary Science* 1984; 37: 371-374.
- 28.- Payne LN. Avian leucosis/ sarcoma in: Virus infections of birds. McFerran JB, McNulty MS. Elsevier Science publishers B.V.1993; 28:411-435.
- 29.- Payne LN, Fadly AM. Leucosis/sarcoma group in: Diseases of Poultry, 10<sup>th</sup> ed. Calnek BW. Iowa state university press. 1997; 414-466.

- 30.- Payne LN. Retrovirus-induced disease in poultry. *Poult Sci* 1998; 77: 1204-1212.
- 31.- Powell PC, Payne LN. Marek's disease. *Virus infections of birds*. McFerran JB, McNulty MS. Elsevier Science publishers B.V.1993. 3: 37-75.
- 32.- Pizarro M, Martinez AR, Sanchez B and Gonzalez M. Diagnóstico diferencial de las lesiones linfoproliferativas en las aves: aspectos clínicos y anatomopatológicos. *Med. Vet.* 1992; 9: 568-572.
- 33.- Prophet EB, Arrington JB. Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas armadas de los Estados Unidos de América. 1995.
- 34.- Russell PH, Ahmad K, Howes K, Payne LN. Some chickens which are viraemic with subgroup J avian leukosis virus have antibody-forming cells but no circulating antibody. *Res Vet Sci* 1997; 63: 81-83.
- 35.- Schat KA. Importance of cell-mediated immunity in Marek's disease and other viral tumor diseases. *Poult Sci* 1991; 70: 1165-1175.
- 36.- Silva RF, Calvert JG and Lee LF. A simple immunoperoxidase plaque assay [to detect and quantitate Marek's disease virus plaques. *Avian Diseases* 1997; 47: 528-534.
- 37.- Smith LM, Brown SR, Howes K, McLeod S, Arshad SS, Barron GS, Venugopal K, McKay JC and Payne LN. Development and application of

- polymerase chain reaction (PCR) tests for the detection of subgroup J avian leukosis virus. *Virus Res* 1998; 54: 87-98.
- 38.- Taylor CR, Shi SR, Chen C, Young L, Yang C and Cote RJ. Comparative study of antigen retrieval heating methods: Microwave, microwave and pressure cooker, autoclave and steamer. *Biotechnic & Histochemistry*; 71: 263-270.
- 39.- Valero G. Diagnóstico veterinario. Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios A.C. 1997.
- 40.- Weinstock D, Schat KA, Calnek BW. Cytotoxic T lymphocytes in reticuloendotheliosis virus-infected chickens. *Eur J Immunol* 1989;19: 267-272.
- 41.- Witter R.L.,. Reticuloendoteliosis. Isolation and identification of avian pathogens. 3th ed. American Association of Avian Pathologist.1989; 143-148.
- 42.- Witter R.L. Reticuloendotheliosis in: Diseases of Poultry. 10th ed. Calnek B.W., Iowa State University Press; 1997: 467-489.
- 43.- Witter R.L. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Diseases* 1997a; 41: 149-163.
- 44.- Witter RL. Avian tumor viruses: persistent and evolving pathogens. *Acta Vet Hung* 1997b; 45(3): 251-66.
- 45.- Witter RL Control strategies for Marek's disease: a perspective for the future. *Poult. Sci* 1998 Aug; 77 (8): 1197-203.