

# **Preguntas frecuentes de enfermedades de tumores virales**

## **1 ¿Se puede esperar el 100% de protección contra la enfermedad de Marek en aves vacunadas?**

No. Al igual que ocurre con otras vacunas no es posible alcanzar el 100% de protección en condiciones de campo desde un punto de vista biológico. En lotes de aves con un sistema inmune saludable, que están correctamente vacunadas y criadas con un manejo adecuado, las pérdidas son bajas, sin un efecto significativo en la vitalidad y/o desempeño. En ponedoras y reproductoras, en casos de desafíos de campo severos a edad temprana, se ha observado mortalidad alrededor de 2.5% y en pollos de engorde se han observado alrededor de 0.05% de decomisos en matadero debido a la enfermedad de Marek.

## **2. ¿Qué vacuna o combinación de vacunas confieren la mejor protección contra desafíos de campo para pollo de engorde, reproductoras y ponedoras comerciales?**

**Pollo de engorde** son vacunados con HVT o HVT+SB1. HVT+SB1 se usa en lugares donde los virus de Marek muy virulentos o vv (siglas en inglés del término *very virulent*) son prevalentes y la vacuna de HVT sola no provee una protección óptima.

En algunos casos, particularmente para aves pesadas (ej. gallos), la vacuna HVT+SB1 podría no conferir la protección adecuada debido a la prevalencia de virus de Marek mucho más virulentos o vv+ (siglas en inglés del término *very virulent plus*). En estas circunstancias, la vacuna bivalente HVT+CVI988 (Rispen) o la trivalente HVT+SB1+CVI988 (Rispen) han sido usadas.

El uso de vacunas por debajo de la dosis recomendada es una práctica común en la vacunación de pollo de engorde. Sin embargo debe notarse que esta práctica puede causar brotes de la enfermedad de Marek en presencia de desafíos de campo severos y puede contribuir a acelerar la evolución del virus de Marek hacia una mayor virulencia. La dosis de vacunas se mide en unidades formadoras de placas o PFU (siglas en inglés del término *plaque-forming unit*)

**Reproductoras y ponedoras** comúnmente son vacunadas con la vacuna HVT+CVI988 (Rispen) usando la dosis completa dándole a estas aves longevas la protección más amplia para la enfermedad de Marek. En reproductoras, la vacuna trivalente HVT+SB1+CVI988 (Rispen) se ha usado cuando los virus de Marek vv+ son prevalentes en la zona.

## **3. ¿Cuándo hacer un cambio en la estrategia de vacunación (de HVT a HVT+SB1, HVT+CVI988 o HVT+SB1+ CVI988) para aumentar el nivel de protección en reproductoras?**

Las reproductoras deberían ser vacunadas preferentemente con la vacuna bivalente HVT+CVI988 (Rispen) (ver pregunta 2). En casos de protección insuficiente contra la enfermedad de Marek en reproductoras vacunadas con HVT o con HVT+SB1, se podría cambiar el protocolo de vacunación a HVT +CVI988 (Rispen) o a HVT+SB1+CVI988 (Rispen).

#### **4. ¿Por qué los datos de decomisos en matadero por si solos no son un buen parámetro para evaluar la protección contra la enfermedad de Marek?**

Las tasas de decomisos no sólo incluyen los casos de decomisos por la enfermedad de Marek sino que también incluyen decomisos por otras enfermedades (ej. problemas respiratorios, enfermedad de Gumboro y septicemia), por lo tanto la tasa de decomisos por si misma no es un buen parámetro para la evaluación de la protección contra la enfermedad de Marek. En los Estados Unidos los decomisos por la enfermedad de Marek se incluyen bajo el término “leucosis” e incluyen linfomas en diferentes órganos, heridas en la piel y las patas. En lotes correctamente vacunados, los decomisos debidos a la enfermedad de Marek son consistentemente menores que los decomisos debidos a otras causas.

Además de tumores, el virus de Marek es capaz de inducir síndromes no-neoplásicos incluyendo síndromes neurológicos, lesiones oculares, inmunosupresión y arterioesclerosis. Algunas de estas lesiones no neoplásicas, especialmente la inmunosupresión, podrían contribuir a otras causas de decomisos no tumorales. La única medida directa de la enfermedad de Marek que se tiene en base a la tasa de decomisos es la incidencia de tumores en pollos de engorde. Sin embargo, las tasas de decomisos no proporcionan ninguna información directa de la incidencia de los síndromes no neoplásicos inducidos por el virus de Marek. Aunque se considera que la vacunación protege contra la mayoría de los síndromes no neoplásicos, se sabe poco acerca de cómo protege contra la inmunosupresión inducida por el virus de Marek. Debido a las razones anteriores, los decomisos en matadero por si solos no son un buen parámetro para evaluar la protección contra la enfermedad de Marek.

#### **5. ¿Cómo puede la inmunosupresión causada por el virus de Marek estar presente sin un incremento en la incidencia de tumores?**

El virus de Marek puede inducir inmunosupresión mediante distintos mecanismos y muchos de ellos permanecen sin dilucidar. La inmunosupresión inducida por el virus de Marek puede empezar mucho antes que el comienzo de los tumores. Un gran parte del impacto del virus de Marek, particularmente en los pollos de engorde, es la inmunosupresión inducida por el virus en aves no protegidas. El efecto será un aumento en las infecciones secundarias (ej. aerosaculitis por *E. coli*), pobre respuesta de anticuerpos, baja protección conferida por otras vacunas (ej. vacunación contra bronquitis infecciosa). Recientemente se ha demostrado que es posible detectar una reducción en la ganancia de peso antes que se observe un aumento en la incidencia de tumores en aves parcialmente protegidas contra un desafío de virus de Marek muy virulentos o vv (siglas en inglés del término *very virulent*). La inmunosupresión causada por el virus de Marek requiere mayor investigación y es difícil de evaluar en condiciones de campo ya que no siempre es asociada con la atrofia de los órganos linfoides.

#### **6. ¿Cuáles son los beneficios de la doble vacunación en las reproductoras?**

La doble vacunación puede aumentar la protección en condiciones de campo y de laboratorio. Varios programas de doble vacunación han sido usados: a) Vacunación *in ovo* seguida por una revacunación en la nacedora, b) Vacunación a un día de edad en la nacedora seguida por revacunación un par de horas después o al llegar a la granja. También hay ejemplos donde la

vacunación a un día de edad ha sido seguida por revacunación varios días después, hasta 2 - 3 semanas en la granja.

Estudios recientes han demostrado que el beneficio de la doble vacunación requiere el uso de una vacuna más protectora como segunda vacuna. Además la administración de la primera vacuna *in ovo* seguida por revacunación en la nacedora al día de edad es la estrategia de doble vacunación más beneficiosa; no solo debido a la mejor protección sino también debido a la logística. En este programa de revacunación todas las vacunas son aplicadas en la nacedora antes que las aves tengan contacto con el virus de campo. En otros programas de revacunación la segunda vacuna debe ser administrada en la granja, probablemente después que las aves hayan sido expuestas al virus de campo.

Finalmente, siempre existe la posibilidad de que algunos pollos no reciban la vacuna o una dosis completa en una sola vacunación. La revacunación minimizaría el número de pollos que no reciban la primera vacuna y es poco probable que un pollo no sea vacunado en ambos casos.

## **7. ¿Puede el virus de Marek estar presente en infecciones mixtas con retrovirus (virus de la reticuloendoteliosis, virus de la leucosis aviar)?**

Si, los pollos infectados con el virus de Marek o vacunados contra la enfermedad de Marek también pueden infectarse con el virus de leucosis aviar y/o virus de la reticuloendoteliosis. La infección por el virus de Marek es ubicua y la mayoría, si no todos los pollos, están infectados en condiciones de campo. También es posible que haya tumores inducidos por el virus de Marek en aves infectados al mismo tiempo con retrovirus

## **8. ¿Qué se debe hacer si se sospecha de un fallo de la vacuna de Marek?**

Lo primero que hay que hacer si se sospecha de un fallo en la vacunación contra la enfermedad de Marek es hacer una auditoría a nivel del criadero. Varias compañías productoras de vacunas y de instrumentos usados para la vacunación *in ovo* llevan a cabo estas auditorías y examinan almacenamiento, manipulación, mezcla y proceso de administración de la vacuna.

Los pasos a seguir en caso de un fallo de vacunación contra la enfermedad de Marek son:

- a) Auditoria del mantenimiento de la cadena fría de la vacuna
- b) Titulación de la vacuna para asegurarse de que el título indicado por la compañía productora y el título de la vacuna diluida es correcto y para excluir un efecto negativo del proceso de dilución. Es muy posible que los títulos obtenidos no estén de acuerdo con los estimados por la compañía productora de la vacuna. Variaciones pueden ser debidas a las diferentes condiciones de los cultivos celulares; sin embargo los títulos pueden dar una idea de si la vacuna diluida tiene niveles aceptables de unidades formadoras de placa o PFU (siglas en inglés del término *plaque forming unit*). Si no se puede titular la vacuna, el recuento del número de células vivas en la vacuna se puede usar como estimación (para obtener información adicional referir a la pregunta numero 17).

- c) Determinar la cantidad de ADN de la vacuna en la pulpa de las plumas para determinar si el virus de la vacuna se ha replicado en los pollos vacunados. Este proceso no solo determina si la vacuna se replica en los pollos vacunados, pero también si la vacuna se administro correctamente.
- d) Monitoreo de exposición a los virus de campo. Como se tarda 5-7 días para obtener protección total en pollitos vacunados *in ovo* o por ruta subcutánea al día de edad, una exposición temprana con virus de campo resultará en un fallo de la vacuna.
- e) Eliminar la posibilidad de otras causas de inmunosupresión como infección con los virus inmunosupresores (anemia infecciosa aviar, Gumboro, reovirus, leucosis aviar), micotoxinas y estrés.
- f) Patotipificación del virus de campo más prevalente en la granja. Es posible que la vacuna usada no proteja contra virus de campo muy virulentos o vv (siglas en inglés del término *very virulent*) o mucho más virulentos o vv+ (siglas en inglés del término *very virulent plus*). Como ejemplo, HVT no protege contra virus de Marek vv.

### **9. ¿Puedo utilizar pulpa de la pluma para medir la protección conferida por la vacuna de Marek? ¿Medir el grado de desafío? ¿Diferenciar entre los serotipos del virus de la enfermedad de Marek?**

La prueba de PCR cuantitativa (qPCR) usando pulpa de plumas es muy útil para confirmar que la vacunación ha sido correcta y que la vacuna se está replicando correctamente en las aves. Sin embargo, una replicación adecuada de la vacuna no garantiza que la vacuna vaya a proteger bien. Es posible observar niveles adecuados de vacuna en aves con la enfermedad de Marek cuando:

- a) Las aves se han expuesto a cepas de campo antes de que la vacuna pueda producir una respuesta inmune adecuada
- b) Las cepas de campo tienen niveles muy altos de virulencia y las aves no se pueden proteger con la vacuna usada
- c) Las aves sufren de otras enfermedades inmunosupresoras al mismo tiempo que están infectados con el virus de Marek (por ejemplo anemia infecciosa, enfermedad de Gumboro, reticuloendoteliosis, etc.)

Muestras de la pulpa de la pluma se pueden usar para un diagnóstico temprano de la enfermedad de Marek. Las aves que están desarrollando tumores tienen niveles de ADN del virus de Marek más altos en la pulpa de la pluma y en sangre que las aves que no están desarrollando tumores. La cantidad de DNA viral en la pulpa de las plumas a las 3-4 semanas de edad puede informar de una forma indirecta si los pollos están protegidos contra la enfermedad de Marek.

La prueba de qPCR permite diferenciar entre serotipos (por ejemplo, virus de serotipo 1 (cepas patogénicas de campo y vacuna CVI988/Rispens) vs. vacunas de serotipo 2 (por ejemplo SB1) y serotipo 3 (HVT). Sin embargo, técnicas moleculares como qPCR no pueden usarse para diferenciar patotipos. Patotipos solo se pueden determinar infectando pollos vacunados con distintos tipos de vacunas con la cepa de campo.

Las muestra de la pulpa de pluma se pueden almacenar congeladas a -70C hasta el tiempo de su procesamiento y análisis o se puede tomar en tarjetas FTA® (papel de filtro tratado con

productos que protegen el ADN/ARN y destruye la proteína y como consecuencia los patógenos) y almacenar a temperatura ambiente (para mas detalles referir a la pregunta 24). Si las muestras de diagnóstico se mandan desde otro país es necesario obtener permisos de importación (APHIS).

**10. ¿Dónde se puede obtener vacunas de Marek para aves de traspatio? ¿Qué productos están disponibles y cómo administrar las vacunas?**

Las vacunas de la enfermedad de Marek se pueden comprar a distintos productores/distribuidores de vacunas aviares. La vacuna de preferencia sería la vacuna bivalente HVT+CVI988 (Rispen) pues es la que proporciona el nivel más amplio de protección. Las vacunas de Marek consisten en preparaciones de células infectadas con el virus vacunal, y para que la vacuna sea efectiva las células se tienen que mantener vivas. La vacuna se tiene que transportar y mantener congelada en contenedores especiales con nitrógeno líquido para mantener una temperatura de -196C. Antes de usar la vacuna se tiene que diluir en un diluyente especial proporcionado por el productor de la vacuna y tiene que aplicarse 1-2 horas después de ser diluida por vía subcutánea en el cuello del pollito en la nacedora.

El número de dosis mínimo por vial en las vacunas comerciales de la enfermedad de Marek es 1000 dosis/vial. Esto puede ser un problema si se tiene que vacunar un número pequeño de pollitos. Después de diluir la vacuna, se tiene que usar inmediatamente y no se puede guardar para usar mas tarde. Se recomienda que los usuarios sigan las instrucciones de transporte, almacenamiento, dilución and mezcla de la vacuna de acuerdo con las instrucciones de la compañía productora.

La mayoría de las vacunas distribuidas por muchos proveedores a través de la red de internet están en forma liofilizada y solo contienen HVT. La vacuna liofilizada, la cual tiene que ser almacenada a 2-7C hasta el momento de ser reconstituida y diluida, solo proporciona un nivel mínimo de protección el cual puede ser suficiente para lotes pequeños y aislados de pollos de traspatio. Una vez reconstituida, la vacuna no se puede almacenar y se tiene que usar inmediatamente (máximo dos horas desde la reconstitución).

**11. ¿Puede la vacuna de Marek proteger contra infección con el virus de Marek?**

No, la vacunación contra la enfermedad de Marek no previene la infección con cepas de campo del virus de Marek pero previene el desarrollo de la enfermedad (tumores). La detección de virus de campo de Marek en lotes vacunados adecuadamente no tiene importancia desde el punto de vista de diagnóstico. La única información que proporciona es que el lote se ha infectado con virus de campo y que esta excretando virus.

**12. ¿Qué relevancia tiene la detección de cepas oncogénicas del virus de Marek en un pollo?**

Ninguna. Todos los pollos en el campo están expuestos a cepas de campo oncogénicas que son ubicuas en la industria avícola. Las vacunas de Marek protegen contra el desarrollo de tumores pero no contra la infección con cepas oncogénicas. Cepas oncogénicas del virus de Marek se

pueden detectar en pollos que nunca tendrán tumores porque están vacunados y protegidos de forma adecuada.

### **13. ¿Qué repercusiones tiene mezclar otras vacunas con la vacunas de Marek?**

La mezcla de vacunas de Marek con otras vacunas para ser administradas al mismo tiempo *in ovo* o al día de edad puede interferir con la eficacia de la vacuna de Marek. Sólo se pueden mezclar vacunas que han sido recomendadas por el productor y a las concentraciones especificadas. Mezcla de vacunas en contra de las recomendaciones de los fabricantes se considera “uso extraoficial” y puede resultar en una respuesta inadecuada a la vacuna de Marek.

### **14. ¿Qué repercusiones tiene la adición de antibióticos a las vacunas de Marek?**

Oficialmente ningún antibiótico ha sido aprobado o autorizado para su uso en las vacunas de Marek. Sin embargo, a veces se usan antibióticos de forma extraoficial en los diluyentes de vacunas, sobre todo para pollos de engorde. Los antibióticos usados con más frecuencia son gentamicina y ceftiofur. Si se usan a la dosis recomendada, no se ha observado ningún efecto deletéreo en la eficacia de las vacuna de Marek. Sin embargo, el uso a dosis más altas de las recomendadas tiene un efecto deletéreo debido a cambios en el pH o en la osmolaridad del diluyente. En los Estados Unidos y en otros países, estos antibióticos solo se pueden administrar con receta veterinaria. En algunos casos se añade un colorante al diluyente para monitorear que la vacunación se ha llevado a cabo de forma adecuada. El colorante a usar tiene que ser el recomendado por el fabricante de la vacuna y a la concentración adecuada. Los antibióticos y el colorante tienen que mezclarse con el diluyente antes de que la vacuna sea añadida.

### **15. ¿Puede usarse simultáneamente vacunas HVT ordinarias junto con vacunas HVT recombinantes?**

No. No debe vacunarse simultáneamente con vacunas HVT ordinarias y vacunas HVT recombinantes. Tampoco debe administrarse vacuna HVT convencional *in ovo* seguida de HVT recombinante al nacimiento o viceversa. La vacuna HVT interfiere con la vacuna HVT recombinante de manera que resulta una protección muy pobre contra la (s) proteína (s) foránea (s) insertada (s) en el vector HVT (e.g. Newcastle, virus de Gumboro). Sin embargo, no se ha observado un efecto negativo en la protección contra Marek.

### **16. ¿Cuál es la dilución máxima (dosis mínima) de vacuna de Marek capaz de proteger contra la enfermedad de Marek?**

Bajo el contexto de este documento es difícil establecer la dosis mínima de vacuna comercial que proporciona protección efectiva contra la enfermedad de Marek. Esta información debe ser solicitada a la empresa productora de vacunas. La concentración de virus en la vacuna es expresada en unidades formadoras de placa o PFU (siglas en inglés del término *plaque-forming unit*) por dosis. En general, una placa equivale a una célula infectada con virus (e.g. en el caso de una vacuna HVT con un título de 5000 PFU por dosis, la vacuna contiene aproximadamente 5000 células infectadas con HVT por dosis.

Como regla general, el título vacunal por dosis debe ser 2000 PFU para HVT, y 1000 PFU para SB1 y CVI988 (Rispens). Cada fabricante de vacuna debe establecer su título para liberación de lotes de vacuna y esto puede diferir entre diferentes empresas. La industria avícola requiere altos títulos PFU para aves de vida prolongada como reproductoras y ponedoras y como mínimo títulos de 5000 PFU/dosis para HVT y 3000 PFU/dosis para SB1 o CVI988 (Rispens). La administración de dosis de vacunas de Marek inferiores a las recomendadas es una práctica común en la industria de producción de pollos de engorde de los Estados Unidos y usualmente se requieren títulos PFU de 4000/dosis para HVT y 3000/dosis para SB1. La administración de dosis inferiores a las recomendadas puede dar como resultado una protección insuficiente en situaciones de campo con alto desafío del virus de Marek (ver la pregunta 5).

### **17. ¿Puedo utilizar conteos de células viables para titular vacunas?**

No. El conteo de células vivas proporciona una idea de cómo las vacunas han sido manejadas durante el transporte, dilución, vacunación, etc. Si las vacunas han sido manejadas inapropiadamente el número de células vivas será bajo y el título de la vacuna será bajo. La mayoría de las vacunas actuales son asociadas a células, congeladas y producidas en cultivos celulares. Las células infectadas son cosechadas y conservadas con estabilizadores específicos en ampolleta (viales) almacenadas a -196C en nitrógeno líquido. Debe recordarse que debido a la característica de ser asociadas a células, las vacunas contra Marek se inactivan si las células mueren. Es crítico mantener a las células viables para mantener el título infeccioso. Un conteo muy bajo de células viables puede indicar un título bajo de virus. Sin embargo, si el total de células viables es alto, esto no significa necesariamente que el título de la vacuna sea alto dado que no todas las células están infectadas con virus vacunal. La única manera de conocer el título real de la vacuna es titulándola en cultivo celular para el conteo de placas, y el título es expresado en unidades formadoras de placa o PFU (siglas en inglés del término *plaque-forming unit*) por dosis.

### **18. ¿Es seguro consumir pollo infectado con virus tumorales?**

Sí. A pesar de numerosos estudios epidemiológicos no se ha demostrado que los virus de Marek y de leucosis aviar sean una preocupación de salud pública. Ni el virus de Marek ni los virus de leucosis pueden infectar humanos y no inducen ninguna enfermedad en humanos. No existe absolutamente ninguna preocupación en salud pública.

### **19. ¿Cuál es la incidencia normal de tumores en aves comerciales?**

Depende de la etiología de los tumores. La mayoría de las líneas genéticas comerciales están libres de retrovirus exógenos y por ello la incidencia de tumores debida a estos virus debe ser nula. Sin embargo, se ha reportado que aves libres de patógenos específicos que están libres de retrovirus exógenos pueden desarrollar linfomas espontáneos. La incidencia sería extremadamente baja y las pérdidas económicas asociadas con esos tumores es mínima o nula. Sin embargo, en condiciones de campo, es importante determinar la etiología de esos tumores para eliminar la posibilidad de que las aves estén infectadas con retrovirus exógenos.

El virus de Marek es ubicuo y las vacunas no protegen al 100% de las aves. Se ha considerado que la eficacia de las vacunas contra la enfermedad de Marek es 95-97% bajo condiciones experimentales. La eficacia de las vacunas puede verse reducida en condiciones de campo cuando el desafío con virus de Marek ocurre a muy temprana edad (antes de que la inmunidad inducida por las vacunas se haya establecido completamente) y también debido a la posible presencia de otras enfermedades inmunosupresoras. Por ello, sería normal que algunas aves desarrollen la enfermedad de Marek y se vean afectadas por tumores. Sin embargo, un incremento en la incidencia de tumores inducidos por el virus de Marek requeriría una re-evaluación de los protocolos y procesos de vacunación, medidas de bioseguridad, control de otras enfermedades inmunosupresoras y/o la existencia de patotipos del virus de Marek de mayor virulencia.

## **20. ¿Cuáles son los tejidos que deben ser enviados para histopatología en caso de sospechar de tumores?**

Deben tomarse muestras de tumores junto con tejido adyacente normal, varios plexos nerviosos (nervios ciáticos, braquiales y vagos), bolsa de Fabricio si aún está presente y cualquier otro tejido con lesiones sospechosas. Las muestras deben obtenerse de aves recientemente sacrificadas o que hayan muerto en las últimas 24 horas. Para mayores detalles ver la página 11 del Manual de Diagnóstico de Tumores.

La importación de muestras fijadas en formalina a los Estados Unidos debe hacerse siguiendo los reglamentos y con los permisos de importación requeridos. Contactar el laboratorio de diagnóstico por adelantado para obtener el permiso de importación de APHIS que debe acompañar las muestras.

## **21. ¿Cómo se deben fijar los tejidos para histopatología?**

Todas las muestras deben ser colocadas al momento de su recolección directamente en formalina neutra tamponada al 10%. Debe usarse una tasa de 10:1 de formalina y tejido. Es decir, 10 partes de formalina por cada parte de tejido (v/v). Las Figuras 1 y 2 muestran una manera errónea de enviar los tejidos. Asegúrese que las muestras son tomadas de animales recién sacrificados o que no lleven muertos más de 24 horas.



Figura 1

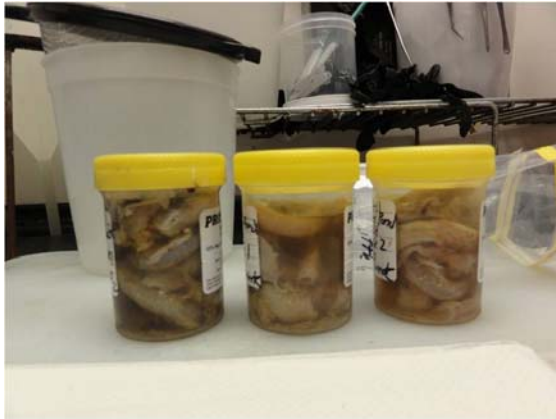


Figura 2



Si las muestras son enviadas en *cassettes* (en cajitas de plástico para histopatología), no debe sobrecargarse la cajita con tejidos. Note las marcas dejadas por el *cassette* en el tejido mostrado en la Figura 3, lo cual puede inducir artefactos que afectan la interpretación microscópica.

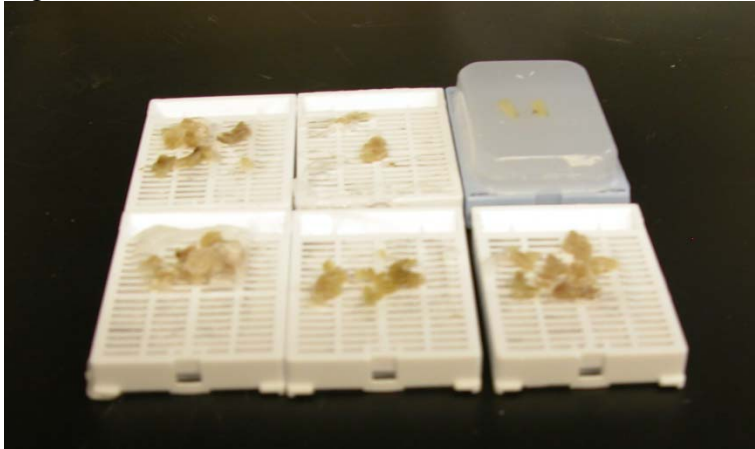
Figura 3



## 22. ¿Cómo se deben enviar las muestras fijadas en formalina?

Las muestras fijadas se deben mandar en un envase hermético pues la formalina se considera un líquido peligroso. Alternativamente, después de haber fijado los tejidos durante 24 horas, se puede eliminar la mayor parte de la formalina y sellar el recipiente para evitar fugas y para prevenir que los tejidos se deshidraten. Si las muestras van a ser enviadas por correo aéreo no se recomienda empacarlas en bolsas plásticas estériles para muestreo (*Whirlpak*) ya que debido a la falta de presión de aire en el área de carga del avión las muestras se comprimen y se deforman (como suele pasar con muestras de ojo). Se puede enviar bloques de parafina pero se debe tener en cuenta que si las muestras son transportadas en áreas calurosas o durante épocas de altas temperaturas la parafina se puede derretir como se ilustra en la Figura 4.

Figura 4



Debe incluirse información relacionada a las muestras tanto sobre el recipiente así como en el formulario de envío de muestras al laboratorio. Deben describirse los signos clínicos y la historia de vacunación contra la enfermedad de Marek. Si no hay disponible un formulario de envío de muestras debe proporcionarse una historia completa de la parvada afectada, incluyendo la edad, tipo de ave (pollos de engorde, reproductoras, ponedoras, etc.). La frase “Tejidos Para Histopatología” no constituye una historia o una descripción de razones para el envío de muestras, sino sólo la prueba de laboratorio solicitada.

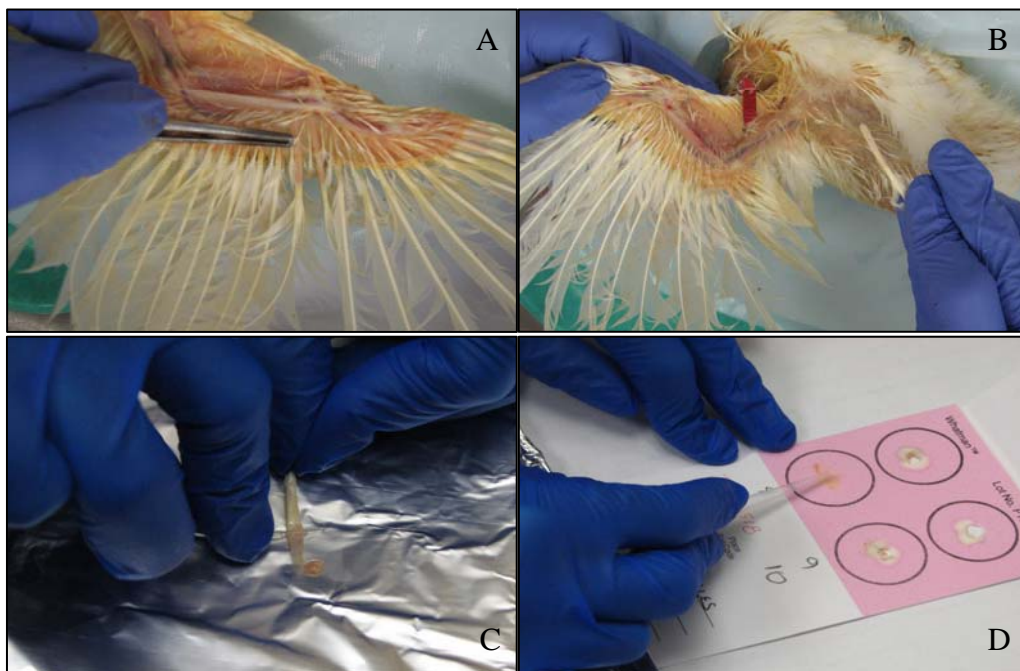
### **23. ¿Cómo el PCR en tiempo real puede ayudar en el diagnóstico de la enfermedad de Marek? Por qué el PCR convencional no puede ser utilizado para el diagnóstico de la enfermedad de Marek?**

El virus de Marek es ubicuo y todos los pollos (sanos y enfermos) pueden estar infectados con virus oncogénicos. Si el virus de Marek está en su estado de latencia, los pollos están saludables (pero infectados). Si la infección con el virus de Marek progresa al estado neoplásico entonces los animales infectados desarrollarán la enfermedad de Marek. Cualquier técnica que solo permita detectar la presencia de virus de Marek oncogénico tales como: aislamiento del virus, PCR convencional, detección de antígenos, secuencia del gen oncogénico meq...etc., no tienen ningún valor diagnóstico debido a la ubicuidad de este virus en el campo. Esto sólo indica que los pollos han sido infectados con un virus de Marek oncogénico pero no dice nada acerca del estatus de la enfermedad en el animal. El PCR en tiempo real permite la cuantificación de la carga del ADN del virus de Marek presente. Ha sido demostrado que tumores inducidos por el virus de Marek tiene muchas más copias del ADN del virus de Marek que tejidos infectados en estado de latencia. Debido a esto, el PCR en tiempo real permite diferenciar entre tumores inducidos por el virus de Marek y tejidos latentemente infectados con el virus de Marek.

**24. ¿Qué muestras son recomendadas para ser analizadas utilizando las técnicas de PCR y/o PCR en tiempo real?**

La muestra ideal para el diagnóstico de la enfermedad de Marek por la técnica de PCR a tiempo real son tumores congelados o improntas de tumores tomadas en tarjetas FTA®. También son aceptables las puntas de plumas congeladas, sangre refrigerada (usando EDTA como anticoagulante) o impresiones de pulpa de plumas o sangre sobre tarjetas FTA®. Cada muestra individual de cada ave debe ser identificada y mantenida por separado. No deben combinarse muestras de varias aves en un solo grupo o *pool* de muestras pues esto podría generar resultados falsos negativos.

Figura 5



Las plumas en crecimiento son la mejor muestra para pulpa de plumas (Figura 5). Deben seleccionarse plumas con abundante pulpa fresca (Figura 5B) y la pulpa de la pluma puede ser extraída mediante compresión usando una punta de pipeta plástica sobre una superficie limpia (Figura 5C). La punta de plástico puede usarse para colocar y extender la muestra de pulpa de pluma sobre la tarjeta FTA® (Figura 5D).

Las impresiones de tejidos y de sangre también pueden hacerse sobre tarjetas FTA®. Si varias muestras son tomadas en el mismo círculo de la tarjeta FTA®, se debe asegurar que las muestras no se mezclen entre sí. Esto puede dar falsos negativos.

Para importar a los Estados Unidos de América muestras recolectadas en tarjetas FTA® se deben seguir las regulaciones estatales y federales estipuladas incluyendo los permisos adecuados. Contacte el laboratorio de diagnóstico elegido por adelantado para obtener la

información necesaria de envío de este tipo de muestras así como los permisos (APHIS) y documentación requerida.

## **25. ¿Cómo puede ayudar el aislamiento viral en el diagnóstico de enfermedades tumorales?**

El aislamiento viral ayuda en la detección de retrovirus exógenos de la leucosis aviar y del virus de la reticuloendoteliosis. La mayoría de las líneas genéticas son libres de retrovirus exógenos y por esto no deben ser detectados en líneas comerciales. Sin embargo el aislamiento de virus de Marek oncogénico no tiene ninguna validez diagnóstica.

## **26. ¿Qué muestras/especímenes se recomiendan para enviar al laboratorio para el aislamiento de virus?**

El virus de la enfermedad de Marek se puede aislar a partir de la capa blanca de leucocitos, células del bazo y células tumorales. Es preferible enviar las aves al laboratorio. Alternativamente se puede enviar muestras de sangre completa (con heparina como anticoagulante), células del bazo o incluso células tumorales mantenidas en refrigeración dentro de un periodo de hasta 2 horas.

Varios especímenes pueden ser enviados para detectar retrovirus infecciosos, antígeno viral o anticuerpos. Muestras de sangre completa o plasma sanguíneo son usadas comúnmente para el aislamiento de virus. Así mismo, hisopos cloacales y/o vaginales y muestras de albumen de huevo también pueden ser usadas para la detección de antígeno viral. Todas las muestras que se tomen para la detección biológica de retrovirus infecciosos deben ser colocadas sobre una cama de hielo y almacenadas tan pronto como sea posible en un congelador a -70 C. Las muestras para la detección del antígeno viral específico de grupo (p27 o “gsa”) del virus de la leucosis aviar deben ser colocadas en una solución buffer apropiada para la prueba y almacenadas a -20 C. Como ejemplo las muestras para la prueba ELISA para detección de antígeno se colectan en una solución fosfatada buffer (“PBS”) conteniendo 0.1% de Tween 80.

La mayoría de los laboratorios de diagnóstico de los Estados Unidos de América no pueden recibir muestras para aislamiento viral provenientes de otros países (ley federal). Por lo tanto en estos casos es necesario contactar a un laboratorio de referencia de la OIE y seguir los procedimientos/requisitos para el envío de muestras.

## **27. ¿Qué significa el diagnóstico (detección) del subgrupo E del virus de leucosis aviar? ¿Este subgrupo E puede causar tumores? ¿Cómo se explica la detección del subgrupo E en líneas de aves de emplume lento vs aves emplume rápido mediante la prueba de PCR?**

Los virus de leucosis aviar endógenos o subgrupo E se transmiten genéticamente y se encuentran como virus completos o defectivos en el genoma de prácticamente todos las estirpes o líneas de gallinas y pollos comerciales normales. Hasta la fecha, no se sabe con certeza si estos virus pueden causar el desarrollo de tumores. Sin embargo, algunos de ellos han sido asociados con

una mayor susceptibilidad a infecciones causadas con virus exógenos de la leucosis aviar que pueden causar tumores. Las líneas de emplume lento portan un gen conocido como EV21 que está íntimamente asociado con el gen responsable por esta característica genética (líneas también conocidas como autosexables). El diagnóstico de virus endógenos (subgrupo E de virus de leucosis aviar) se puede lograr a través de la inoculación de cultivos celulares de fibroblastos de líneas genéticas que son resistentes y susceptibles a estos virus.

### **28. ¿Por qué las líneas comerciales de gallinas y pollo de engorde no son libres de virus del subgrupo E del virus de la leucosis aviar?**

La gran mayoría de la líneas comerciales de gallinas y pollo de engorde no son libres de virus endógenos (subgrupo E) o de genes pertenecientes a estos virus que se encuentran incorporados al genoma de las células somáticas y germinales de estas aves. Estos virus o genes endógenos se transmiten genéticamente y de manera Mendeliana de las aves adultas (ambos sexos) a su progenie. Se puede lograr el desarrollo de líneas libres de virus o genes del subgrupo E por medio de procedimientos intensos de selección. Esto se ha logrado en algunas líneas usadas en la investigación principalmente pero no en las líneas comerciales ya que esta selección tiene un efecto negativo sobre las características de producción que son económicamente importantes para la industria.

### **29. ¿Cuál es la diferencia entre virus endógenos y virus exógenos?**

Los virus endógenos o genes de virus endógenos se encuentran en las células somáticas y germinales de casi todas las gallinas y pollos comerciales y se transmiten genéticamente. Los virus exógenos son virus infecciosos que se transmiten verticalmente (de la gallina a su progenie) y/o horizontalmente por contacto entre aves infectadas a aves susceptibles. Los virus y genes endógenos pertenecen al subgrupo E del virus de la leucosis aviar, mientras que los virus exógenos pueden pertenecer a 5 subgrupos diferentes: A, B, C, D y J.

### **30. ¿Se pueden diagnosticar tumores sin tener un diagnóstico positivo de un virus tumoral?**

Muchos de los tumores en las aves domésticas son causados por infecciones con virus, sin embargo, no todos los tumores son causados por virus. Existen casos específicos donde se pueden encontrar tumores en la ausencia de virus (como en el carcinoma de las células escamosas de la piel, el adenocarcinoma ovárico, etc.). Casos esporádicos de linfomas sin la presencia de algún virus se han diagnosticado en aves libres de patógenos específicos o SPF (siglas en inglés del término *specific pathogen free*). Existen dos grupos de virus capaces de causar tumores: herpesvirus (enfermedad de Marek) y retrovirus (leucosis aviar, reticuloendoteliosis aviar y la enfermedad linfoproliferativa de los pavos).

El virus de la enfermedad de Marek siempre está presente en los tumores inducidos por esta enfermedad. Sin embargo, el virus también puede estar presente en forma latente en tejidos infectados que no muestran ningún tumor. La detección del virus de Marek por sí sola tiene poco significado desde el punto de vista diagnóstico. Por lo tanto, la cuantificación de la carga de ADN viral en un tejido tumoral es requerida para determinar la etiología o causa del tumor.

Debido a que los virus de la leucosis aviar se encuentran ampliamente diseminados su aislamiento y detección de antígeno o anticuerpos puede tener poco significado. Sin embargo, estos métodos se utilizan en los programas de monitoreo y han sido parte de las herramientas de diagnóstico en la erradicación de los virus exógenos en las parvadas de reproductoras. Lesiones características o patognomónicas tanto macroscópicas y/o microscópicas causadas por los virus de la leucosis aviar pueden ser identificados sin demostrarse la presencia de virus o anticuerpos. En estos casos, la inmunohistoquímica y pruebas moleculares son usadas generalmente para identificar el fenotipo de las células tumorales.

### **31. ¿Cómo se determina la causa principal de un problema tumoral?**

El diagnóstico de enfermedades tumorales en las aves domésticas es un proceso que requiere algunos pasos. Este proceso es descrito con detalle en el Manual de Diagnóstico de Enfermedades Tumorales publicado y distribuido por la Asociación Americana de Patólogos Aviarios (AAP). Los pasos para el diagnóstico se describen en el siguiente resumen:

**1. Datos clínicos y epidemiológicos:** el desarrollo de los tumores inducidos por retrovirus toma más tiempo que el de los causados por el virus de la enfermedad de Marek. Los tumores en aves menores de 14 semanas generalmente son causados por el virus de la enfermedad de Marek. Tumores en aves mayores de 14 semanas pueden ser inducidos tanto por el virus de la enfermedad de Marek como por retrovirus.

**2. Lesiones macroscópicas:**

- a. Los retrovirus no inducen tumores en los nervios, de tal manera que si se observan tumores viscerales junto con nervios periféricos hipertróficos es muy probable que el diagnóstico sea enfermedad de Marek. En los casos donde no hay lesiones en los nervios, tanto el virus de la enfermedad de Marek como los retrovirus pudieran ser la causa.
- b. Los tumores en la bolsa de Fabricio en la mayoría de los casos son producidos por retrovirus. Sin embargo, el virus de la enfermedad de Marek también puede causar tumores en la bolsa de Fabricio que tienen que ser diferenciados mediante un análisis histopatológico.

**3. Histopatología:**

- a. Los retrovirus pueden causar la transformación intrafolicular de la bolsa de Fabricio, mientras que el virus de la enfermedad de Marek puede causar una transformación interfolicular. Esta diferencia puede ser de ayuda en el diagnóstico, sin embargo no siempre hay lesiones presentes en la bolsa de Fabricio.
- b. La presencia de lesiones linfoproliferativas en los nervios periféricos pueden confirmar un diagnóstico de enfermedad de Marek.
- c. Los tumores causados por el virus de Marek están compuestos por una población heterogénea de células, mientras que en el caso de los retrovirus las células tumorales son homogéneas. Las características de las células en los tumores se

pueden apreciar siempre y cuando los tejidos hayan sido fijados correctamente y no hayan sufrido cambios post-mortem.

- d. La presencia de lesiones en el encéfalo y en el ojo son indicadores de infecciones con el virus de la enfermedad de Marek mas por si solos no son suficientes para hacer un diagnóstico de la enfermedad.

#### **4. Otras pruebas confirmatorias:**

- a. Enfermedad de Marek
  - i. Pruebas de PCR a tiempo real a partir de tumores, sangre completa y pulpa del folículo de la pluma. Los tumores causados por la enfermedad tienen una mayor cantidad de ADN del virus que en tejidos en donde el virus está presente en forma latente.
  - ii. Inmunohistoquímica. Los tumores causados por el virus de Marek están compuestos por células del tipo T, mientras que los tumores causados por los retrovirus están compuestos por células del tipo B. Los marcadores en las pruebas de inmunohistoquímica pueden diferenciar el fenotipo de las células lo cual es una herramienta valiosa para el diagnóstico. La detección del oncogén conocido como “*meq*” mediante estas pruebas confirma el diagnóstico de enfermedad de Marek.
- b. Retrovirus
  - i. Detección de retrovirus mediante pruebas de PCR o “Southern blot”
  - ii. Aislamiento viral e identificación y serología

### **32. ¿Qué laboratorios están recomendados para el diagnóstico de enfermedades tumorales?**

El laboratorio de USDA-ARS de Oncología y Enfermedades Aviares es considerado el laboratorio de referencia para el diagnóstico de virus tumorales en aves. También es el laboratorio de referencia de la Organización Mundial para la Salud Animal (OIE) para el diagnóstico de Enfermedad de Marek.

Los laboratorios de referencia de la OIE pueden asistir en el diagnóstico de enfermedades tumorales y proveer recomendaciones, entrenamiento y reactivos para estandarizar las técnicas de diagnóstico en otros laboratorios. ADOL puede proporcionar algunos reactivos como anticuerpos monoclonales y policlonales, virus y antígenos de referencia y líneas celulares (<http://www.ars.usda.gov/mwa/lansing/adol>). Usualmente se requiere un acuerdo de transferencia de material entre USDA-ARS y el instituto solicitante.

Primers de PCR para la detección del virus de la reticuloendoteliosis y varios subgrupos del virus de la leucosis aviar están publicados. ADOL puede proporcionar la secuencia de estos primers. (<http://www.ars.usda.gov/mwa/lansing/adol>).

Además de los laboratorios de referencia de la OIE, en los Estados Unidos hay varios laboratorios en universidades o laboratorios de diagnóstico que se especializan en enfermedades de tumores virales que pueden ayudar en el diagnóstico y también aconsejar.

### **33. ¿Cómo diagnosticar reticuloendoteliosis? ¿Es el virus de la reticuloendoteliosis un agente primario o secundario en casos con lesiones tumorales?**

Varias pruebas *in vivo* o *in vitro* pueden ser usadas para la detección del virus de la reticuloendoteliosis en casos sospechosos. Bajo condiciones de campo, el virus de la reticuloendoteliosis pudiera ser la causa primaria de tumores cuando se ha usado una vacuna viva contaminada o si las aves han sido expuestas a edad muy temprana. La presencia del virus de la reticuloendoteliosis se confirma demostrando el antígeno viral o provirus en fibroblastos de embrión de pollo o en aves libres de patógenos específicos inoculados con la muestra sospechosa. Los antígenos virales en cultivos celulares inoculados con la muestra sospechosa se detectan mediante inmunofluorescencia usando anticuerpos monoclonales o policlonales específicos frente el virus de la reticuloendoteliosis. El ADN proviral se detecta por PCR. La amplificación de un fragmento de 291 pares de bases correspondiente al LTR (siglas en inglés del término *long terminal repeat*) del virus de la reticuloendoteliosis se ha empleado para detectar ADN proviral en cultivos de fibroblasto de embrión de pollo y en sangre de aves libres de patógenos específicos inoculadas con las muestras sospechosas. La detección de anticuerpos contra el virus de la reticuloendoteliosis indica una exposición temprana al virus pero es insuficiente para confirmar un diagnóstico.

### **34. ¿Puede la histopatología sola dar un diagnóstico definitivo de la causa de una enfermedad tumoral?**

Histopatología es la prueba primaria que se usa para caracterizar un tumor y ayuda en el proceso de diagnóstico. Histopatología es la mejor técnica para determinar qué tipo de células forman el tumor, la extensión de las lesiones y si el tumor es maligno. Sin embargo, la histopatología tiene limitaciones y no se puede usar para determinar la causa del tumor. Basado en la localización de las lesiones y las características de las células tumorales, a veces es posible proporcionar un diagnóstico tentativo como leucosis linfóide, leucosis mielóide o enfermedad de Marek. Sin embargo, la causa de leucosis linfóide puede ser infección con virus de la leucosis aviar, virus de la reticuloendoteliosis o puede ocurrir como consecuencia de una transformación espontánea. La histopatología no se puede usar para determinar la etiología. Además, la diferenciación entre Marek y leucosis por histopatología no es posible en todos los casos.

### **35. ¿Puedo usar inmunohistoquímica para el diagnóstico diferencial de tumores linfoides? Si es así, ¿pueden tejidos fijados en formalina ser usados?**

Sí, inmunohistoquímica puede ser usada en el diagnóstico de enfermedades tumorales en aves. Si la mayoría de células en el tumor son células T, el tumor podría ser de Enfermedad de Marek. Si la mayoría de células son B, entonces el tumor muy probablemente sea de Leucosis linfóide. Esta técnica sin embargo tiene muchas limitaciones:



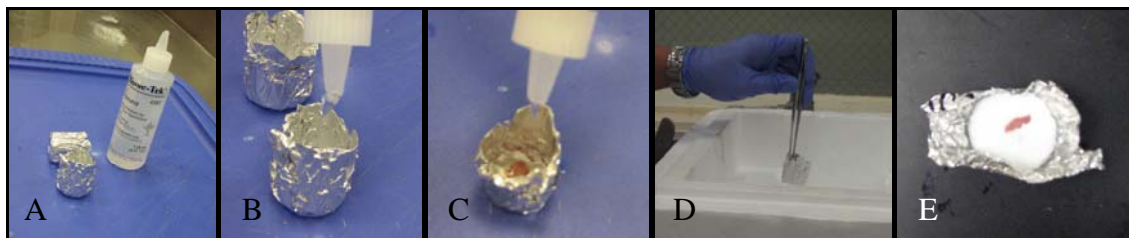
- La reticuloendoteliosis puede producir ambos tipos de tumores así que más evaluaciones deben hacerse cuando se sospeche de esta enfermedad
- Es posible encontrar tumores de células B en aves que no están infectadas con virus exógenos de leucosis aviar. Estos tumores son llamados tumores espontáneos y se creen que puedan ser inducidos por retrovirus endógenos.
- Anticuerpos para detectar fenotipos de células en aves no funcionan en muestras fijadas en formalina. Las muestras deben ser congeladas en nitrógeno líquido. Referirse a la pregunta 36 para entender cómo deben congelarse las muestras. La mayoría de los laboratorios en los USA no pueden recibir muestras de tejidos congelados provenientes de otros países. Contacte el laboratorio de referencia de la OIE si requiere información adicional al respecto.

La inmunohistoquímica puede ser útil para detectar el producto del oncogén del virus de Marek (Meq). La proteína Meq se expresa a niveles muy altos en tumores causados por el virus de Marek y por lo tanto esta prueba se puede usar para confirmar el diagnóstico de enfermedad de Marek. Sin embargo, hay que tener en cuenta que Meq se expresa en el núcleo de la célula y por lo tanto es necesario usar tiramida en el protocolo para amplificar la señal y obtener resultados apropiados. Además, los anticuerpos contra Meq no están disponibles comercialmente.

### 36. ¿Cuál es el método adecuado para congelar muestras para inmunohistoquímica?

La figura 6 muestra los pasos para congelar muestras para inmunohistoquímica. Las muestras deben ser frescas y deben ser congeladas en un medio especial para congelación (OCT, Tissue Tek, Sakura Finetek, Torrance, USA). Una gota del medio OCT debe ser puesto en un molde (Figura 6B), y luego el tejido debe ser puesto sobre la gota del medio OCT (Figura 6C), y el molde debe ser llenado con medio OCT asegurándose que no queden burbujas (Figura 6C). El molde con la muestra y el medio OCT quedara expuesto a los vapores de nitrógeno líquido (Figura 6D) hasta que el OCT se endurezca y quede de color blanco (Figura 6E). El bloque queda listo para ser almacenado a -70C. Antes de cortar la muestra en el criotomo, se recomienda que el bloque congelado permanezca a -20C durante una hora.

Figura 6



**37. ¿Se pueden usar tarjetas FTA para recoger y mandar muestras (pulpa de plumas, tumores) para el diagnóstico de tumores?**

Sí, muestras de tumores y pulpa de plumas se puede recoger en tarjetas FTA® para confirmar la enfermedad de Marek usando PCR a tiempo real. Muestras recogidas en tarjetas FTA® también se pueden usar para detectar la presencia/ausencia de retrovirus usando PCR y primers específicos para virus de la leucosis aviar exógenos. Para más información en como tomar muestras en tarjetas FTA® referir a la pregunta 24.