



## **ARTICULOS DE REVISIÓN Y REFLEXIÓN**

## Evaluación de las técnicas de diagnóstico de la enfermedad de Marek

### Evaluation of diagnostic techniques of Marek disease

Carlos A. Ramírez, MVZ, MBA<sup>1</sup>, Fernando Castro MVZ esp.<sup>2</sup>, Isabel M. Gimeno, DVM, PhD, DACPV<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Incuavícola Quindío S.A, Barcelona, Quindío, Colombia; <sup>2</sup> Universal Avícola & CIA S en C, Cali, Colombia;

<sup>3</sup> North Carolina State University, College of Veterinary Medicine, Raleigh, NC, USA

Isabel\_Gimeno@ncsu.edu

Recibido 25 de febrero de 2010; Aceptado 5 de abril de 2010

#### Resumen

*El diagnóstico de las enfermedades tumorales en avicultura es complejo y las consecuencias económicas de un diagnóstico incorrecto son muy graves. Esta revisión está dirigida a los profesionales en el campo avícola con el fin de clarificar conceptos básicos para el diagnóstico diferencial de las enfermedades neoplásicas. En particular se ha prestado mayor atención a la enfermedad de Marek (MD) y al diagnóstico diferencial entre MD y los tumores inducidos por retrovirus. El trabajo incluye la descripción de los diferentes agentes causales de enfermedades neoplásicas en avicultura; los diferentes métodos para el diagnóstico diferencial y para el diagnóstico precoz de MD; así como recomendaciones sobre la toma de muestras y métodos de conservación adecuados para cada método diagnóstico.*

*Palabras clave: Avicultura retrovirus, salud pública, tumores*

#### Abstract

*The diagnosis of tumor diseases in poultry is very complex and the economical consequences of an incorrect diagnosis extremely severe. This paper is written for the professionals in poultry industry to clarify important concepts in the differential diagnosis of tumor diseases in poultry. In particular, the focus of this work has been on the diagnosis of Marek's disease (MD) and the differential diagnosis between MD and tumors induced by avian retroviruses. The paper has been divided into various sections that include a description of the different agents able to induce tumors in poultry; a complete review of the currently available methods for the diagnosis of tumor diseases and also for the early diagnosis of MD; and guidance for collection and storing of the adequate samples for each diagnostic procedure.*

*Key words: poultry, public health, retroviruses, tumors.*

## Introducción

La enfermedad de Marek (MD) es una enfermedad linfoproliferativa de los pollos de gran relevancia para la industria avícola debido a las pérdidas económicas que ocasiona (Marek, 1907). La enfermedad es causada por un  $\alpha$ -herpesvirus, que fue aislado por primera vez en 1968 (Churchill y Biggs, 1968; Nazerian, 1968). El virus de la enfermedad de Marek (MDV) se diferencia de los otros  $\alpha$ -herpesvirus por estar estrictamente ligado a células (Calnek et al., 1970), establecer estados de latencia en los linfocitos (Calnek et al., 1984), incluir un oncogén (meq) en su genoma (Jones et al., 1992), y ser capaz de inducir linfomas (Biggs y Payne, 1967). El MDV incluye tres serotipos, que se diferencian entre sí tanto en su genoma como en sus características biológicas (Bülow y Biggs, 1975; Bülow et al., 1975). El serotipo 1 se aísla generalmente en pollos e incluye todas las cepas oncogénicas y sus formas atenuadas; el serotipo 2 se aísla solo en pollos y no tiene propiedades oncogénicas; y el serotipo 3 son los virus de pavos que carecen también de propiedades oncogénicas. Los virus del serotipo 3 son generalmente conocidos como herpesvirus de pavos o HVT por las siglas de su nombre en inglés. Los tres serotipos han sido puestos taxonómicamente en el género *Mardivirus*. Se ha propuesto que los tres serotipos se clasifiquen en grupos diferentes (Os-

terrieder y Vautherot, 2004). Los virus de los serotipos 2 y 3, así como las cepas atenuadas del serotipo 1 son usados como vacunas.

La MD ha sido controlada mediante la utilización de vacunas desde finales de la década de los 60's (Churchill et al., 1969; Rispens et al., 1972; Witter et al., 1970). La eficacia de las vacunas de MD es muy alta pero aun aparecen casos aislados que ocasionan pérdidas económicas importantes. Existen múltiples factores que contribuyen a la presentación de casos en el campo (Figura 1). La evolución constante del MDV hacia formas más virulentas ha contribuido a disminuir la eficacia de la vacunación (Witter, 1997). Por otra parte, los llamados "fallos vacunales" son responsables también de los casos esporádicos que aparecen en el campo. Los "fallos vacunales" pueden ocurrir por diferentes motivos, entre otros: almacenamiento y/o manejo incorrecto de las vacunas; combinación de la vacuna de Marek con otras vacunas; adición de antibióticos a la vacuna de Marek; exposición temprana al virus; y coinfección con agentes inmunosupresores.

El monitoreo de MD en el campo es complejo ya que infección y enfermedad no van necesariamente ligados. La prevalencia de la infección con MDV en el campo es cercana al 100%, sin embargo la morbilidad o mortali-

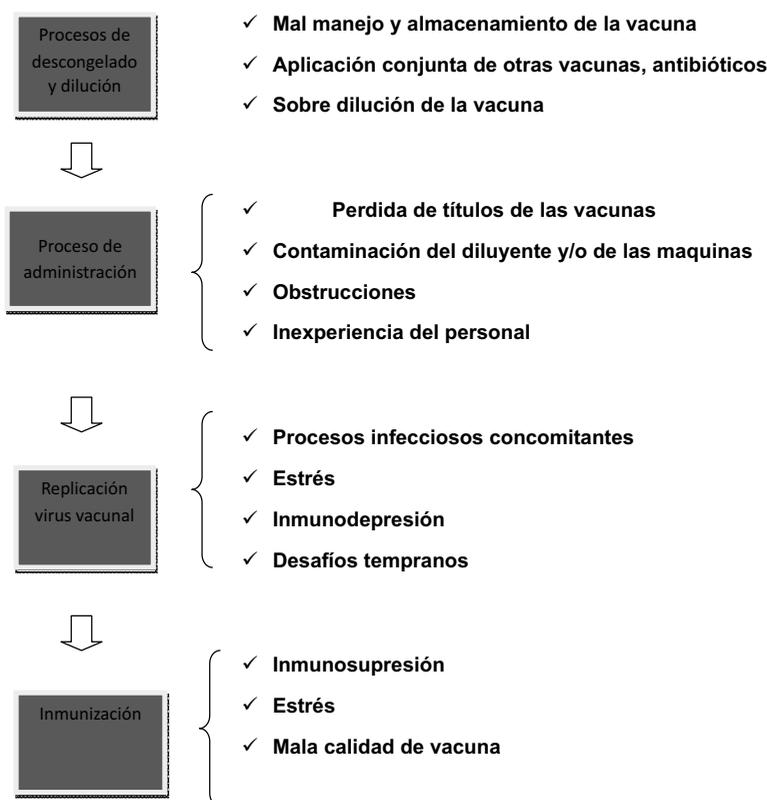


Figura 1. Factores que afectan el proceso de inmunización contra Md en las aves comerciales

dad por MD es mucho más baja. La detección de MDV por sí sola no es un criterio diagnóstico de MD. La detección de anticuerpos neutralizantes tampoco puede ser usada para medir el nivel de protección conferido por la vacuna. La vacunación induce una respuesta humoral muy fuerte con producción de anticuerpos neutralizantes pero la presencia de anticuerpos neutralizantes no protege contra la presentación de tumores (Schat, 1992). La monitorización de la eficacia de las vacunas a nivel de campo también es compleja y son muchos los trabajos que se han realizado para desarrollar métodos que permitan determinar si los animales están correctamente inmunizados contra MD. La asociación entre los niveles de viremia de HVT y la protección contra MD se ha sugerido en varios trabajos (Cho et al., 1976; Okazaki et al., 1973). Recientemente, Baigent et al., (2007) desarrollaron la técnica de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (real time PCR), para medir la cantidad de ADN del virus vacunal. De acuerdo con estos autores este método se puede utilizar para confirmar que la administración de la vacuna fue correcta. Sin embargo cuando el virus de campo es suficientemente virulento, la cantidad de virus vacunal no está relacionada con protección (Gimeno et al., 2008). La cuantificación del genoma viral del virus de campo, por el contrario, si permite una detección precoz de fallos en la inmunización (Gimeno et al., 2008; Islam et al., 2006).

Esta revisión está dirigida a los profesionales en el campo de la avicultura, médicos veterinarios, médicos veterinarios zootecnistas y zootecnistas, con el propósito de brindar conceptos básicos de MD y las diferentes técnicas existentes para su diagnóstico. Los autores de esta monografía confían que esta información será de gran utilidad para el diagnóstico de MD en el campo y proporcionará información sobre las herramientas de laboratorio que existen para el adecuado diagnóstico de la enfermedad.

## Diagnóstico de la enfermedad de Marek

### Diagnóstico diferencial

El diagnóstico de MD, es más complicado en la práctica de lo que normalmente se considera. Desafortunadamente, no existe una lesión macroscópica patognomónica. Además, las lesiones que induce el MDV son muy parecidas a las inducidas por otros virus como son el complejo leukosis-sarcoma virus (ALV), o el virus de la Reticuloendoteliosis (REV). Para complicar más el diagnóstico, la coinfección con varios virus oncogénicos es bastante común (Cui et al., 2003), y en ninguno de los

casos la presencia del virus es indicativa de enfermedad (Witter et al., 2003). El MDV es altamente contagioso y ubicuo entre los pollos, pero sólo un pequeño porcentaje de pollos infectados desarrollan MD. De la misma manera la infección con retrovirus no necesariamente conlleva el desarrollo de tumores. Es posible además encontrar tumores inducidos por retrovirus aunque no se pueda aislar el virus en esos tumores (Witter et al., 2003).

La descripción detallada de todas las enfermedades a considerar en el diagnóstico diferencial de las enfermedades neoplásicas en las aves sobrepasa los objetivos de esta monografía. A continuación se proporciona una lista de las enfermedades que deben considerarse para el diagnóstico diferencial.

Leucosis Linfoide (LL): caracterizada por el desarrollo de linfomas de células B en varias vísceras que surgen de uno o varios folículos neoplásicos en la bolsa de Fabricio. Esta enfermedad esta principalmente causada por subgrupos A y B de ALV, no obstante, otros subgrupos exógenos pueden estar ocasionalmente involucrados. En ciertas condiciones, y cuando existen virus endógenos completos en el genoma de las aves (ALV subgrupo E), ALV-E puede también ocasionar LL.

RE linfoma bursal: este síndrome es un linfoma de células B, virtualmente idéntico a LL, pero causado por la infección de REV.

RE linfoma no bursal: este síndrome es un linfoma de células T. Aun no ha sido reportado en el campo, pero es inducido por la infección de ciertas líneas genéticas de pollos con REV bajo condiciones de laboratorio.

Leucosis mieloides: este tumor está compuesto por células del linaje mieloides y es más común en pollos tipo carne infectados con ALV-J.

Otros tumores: pueden ser confundidos con tumores linfoides o mieloides. Algunos ejemplos incluyen eritroblastosis, sarcomas, nefroblastomas y carcinomas de células escamosas.

Condiciones no neoplásicas: Además de los tumores inducidos por otros virus, existen varias condiciones no neoplásicas que necesitan ser distinguidas de las enfermedades neoplásicas linfoides y mieloides durante el proceso de diagnóstico diferencial.

Neuropatía periférica (PN): síndrome caracterizado por parálisis y engrosamiento de los nervios periféricos. La etiología de este síndrome no está clara pero se trata probablemente de un proceso autoinmune iniciado por la acción de factores pobremente definidos (Bacon et al., 2001). Esta lesión no es un linfoma, pero tiene algunas características linfoproliferativas que pueden

ser fácilmente confundidas con MD, en particular con las lesiones tipo B de los nervios periféricos.

**Neuritis Reticuloendoteliosis (RE):** este síndrome está caracterizado por engrosamiento de los nervios periféricos y se asocia con la infección de REV en pollos jóvenes. El tipo de células son más de tipo inflamatorio que neoplásico. Este síndrome no se acompaña del desarrollo de tumores y aparece normalmente junto a cuadros de inmunosupresión.

**Otras Lesiones no tumorales:** lesiones no neoplásicas como granulomas pueden confundirse con tumores linfoides o mieloides. Un síndrome conocido como histiocitosis multicéntrica (Goodwin y Hafner, 1994; Hafner et al., 1994) ha sido reportado en pollos, su etiología es desconocida pero puede ser confundida con enfermedades neoplásicas. Es de particular relevancia diferenciar la histiocitosis multicéntrica de etiología desconocida de los sarcomas histiocíticos inducidos por ALV-J (Arshad et al., 1997; Pandiri et al., 2009).

Las lesiones granulomatosas (colibacilosis, tuberculosis, aspergilosis, y salmonelosis) también necesitan diferenciarse de las lesiones neoplásicas. Las lesiones de tipo B en los nervios podrían confundirse con procesos autoinmunes y con deficiencias nutricionales. Por otra parte, los signos neurológicos deben ser diferenciados de los ocurridos en la presentación de otras encefalitis víricas (New castle, Influenza) o bacterianas (*S. arizonae*, *E. coli*).

### **Criterios de diagnóstico de MD**

Los métodos para diagnosticar MD se han clasificado en dos grupos: estándar y avanzado. El criterio estándar incluye patologías macroscópicas y microscópicas, acompañadas con características epidemiológicas que son conocidas y viables para todos los que diagnostican. En la actualidad los métodos diagnósticos avanzados que están validados son la inmunohistoquímica para el estudio fenotípico de los tumores y la expresión de meq, el estudio de la reacción de polimerasa en cadena PCR para MD (Gimeno et al., 2005a), el Southern blot/PCR para la inserción de retrovirus en el genoma del pollo (Ewert, 1997).

### **Criterios de diagnóstico estándares**

#### **Criterios epidemiológicos para el diagnóstico de MD**

Tradicionalmente, la diferenciación entre MD y las enfermedades tumorales inducidas por retrovirus se hacía en base a la edad de los animales afectados. Los tumores inducidos por retrovirus no aparecen normalmente en

animales menores de 16 semanas y los inducidos por MDV pueden aparecer en animales jóvenes. En la actualidad esta diferenciación ya no es tan clara. Los tumores inducidos por MDV suelen aparecer en aves de más de 8 o 9 semanas de vida (Kreager, 1997). Sin embargo, se han encontrado reportes de casos en los cuales aves de 3 a 4 semanas de vida han sido afectadas, incluso se puede dar en aves de más edad las cuales ya ha pasado por un proceso de muda forzada (Nicholls, 1984). Cuando aparecen tumores en edad adulta significa que el animal se infectó en los primeros días de vida puesto que si la infección ocurre en animales adultos no se desarrollan tumores (Witter y Gimeno, 2006).

### **Criterios clínicos para el diagnóstico de MD**

La MD puede inducir dos tipos de síndromes, los no neoplásicos o no linfoproliferativos y los neoplásicos o linfoproliferativos. El objetivo de esta monografía es el diagnóstico diferencial de enfermedades oncogénicas en las aves y por lo tanto no vamos a tratar la signología no neoplásica.

Los signos asociados a los procesos neoplásicos pueden ser inespecíficos, como anorexia, caquexia, deshidratación, palidez de piel y mucosas, o neurológicos. La signología nerviosa depende de la localización de las lesiones. Es bastante común observar ceguera por daño en el nervio óptico, retina, coroides, pecten, iris y/o cornea. También se puede apreciar tortícolis, ataxia, tics nerviosos en el caso de lesiones a nivel de sistema nervioso central. En el caso de que las lesiones afecten al plexo braquial se aprecia parálisis de extremidades superiores y si las lesiones afectan al nervio ciático se produce parálisis en las extremidades inferiores.

### **Criterios patológicos para el diagnóstico de MD: Lesiones macroscópicas**

#### *Tumores viscerales*

Los tumores inducidos por MDV se pueden encontrar como infiltrados difusos del parénquima o en forma nodular (Figura 2). Cuando este infiltrado aparece difuso, las vísceras se muestran hipertróficas, con consistencia friable y lesiones puntiformes blanquecinas. En su forma nodular, se destaca la presencia de masas blanquecinas o grisáceas, de consistencia firme y bien delimitada. En los casos en que el crecimiento del tumor es rápido se pueden observar focos necróticos incluidos en la masa tumoral. Las lesiones tumorales en vísceras no son nunca patognomónicas para MD puesto que ALV y REV pueden inducir igualmente este tipo de lesiones.

**Tumores en sistema digestivo:** El hígado y el proventrículo son en general los órganos más afectados

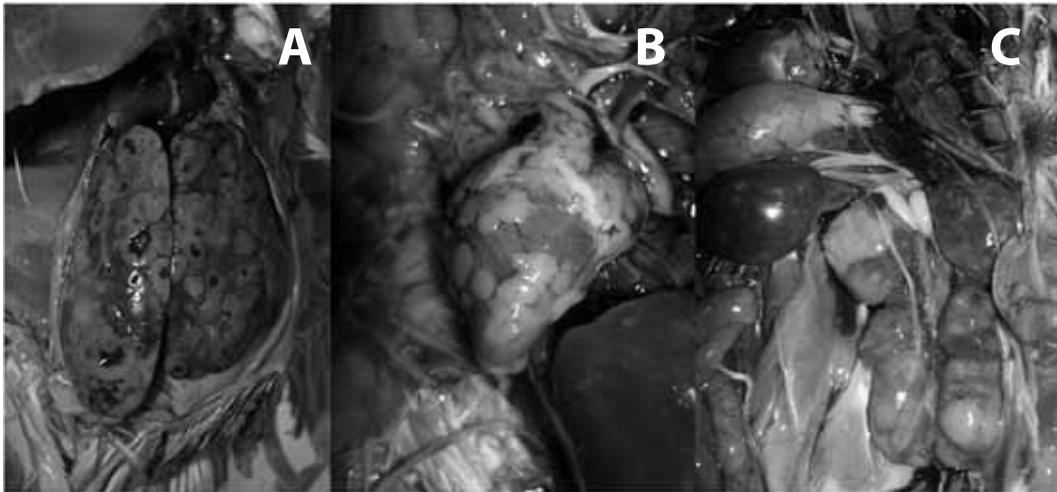


Figura 2: Tumores viscerales inducidos por MDV. (A) Hígado con formaciones nodulares afectando todo el parénquima. (B) Corazón con lesiones multinodulares. Nótese que cuando los nódulos aumentan de tamaño tienden a coalescer y acaban afectando a todo el miocardio; (C) Riñón con lesiones nodulares bilaterales que afectan a los tres lóbulos (Foto: Ramírez et al., 2009).

del aparato digestivo, el tipo de lesión que se presenta puede ser multifocal, nodular o difuso (Figura 2A). El intestino y el páncreas también se pueden afectar aunque en menor frecuencia. Para detectar las lesiones en el proventrículo se aconseja la palpación además de la inspección visual para diferenciarlos de otros casos de dilatación de proventrículo como la proventriculitis transmisible. Cuando el proventrículo presenta tumores de MD la pared tiene una consistencia firme.

**Tumores en órganos linfoides:** El patrón de lesión del bazo puede ser difuso o nodular. Generalmente se observa aumentado de tamaño con manchas blanquecinas. El timo esporádicamente se encuentra afectado, cuando este se afecta, en general se pueden observar lesiones en un solo lóbulo. MDV también puede inducir tumores en la bolsa de Fabricio que se producen debido a la proliferación de las células T intersticiales y tienen que ser diferenciadas de aquellas que se derivan de las células B interfoliculares inducida por retrovirus.

**Tumores en corazón y pulmón:** En el corazón las lesiones comienzan nodulares muy pequeñas y acaban coalesciendo llegando a dar nódulos que afectan gran parte del miocardio (Figura 2B). Los tumores en el pulmón son frecuentes y pueden ser difusos afectando inclusive el parénquima pulmonar o pequeños nódulos que solo pueden ser detectados por palpación.

**Tumores en riñón y gónadas:** Las lesiones en riñón suelen ser bilaterales, difusas de coloración blanquecina y los órganos se encuentran aumentados de tamaño (Figura 2C). En gónadas las lesiones son muy frecuentes y en el caso de los testículos lo normal es que se presenten en forma unilateral. En ovarios inmaduros las primeras lesiones se observan en forma de coliflor, en lesiones más graves los tumores se muestran como una masa sólida blanquecina.

### Lesiones cutáneas

Las lesiones cutáneas son la causa número uno de decomisos de pollos de engorde en las plantas de sacrificio. Estas lesiones se inician como una perifolliculitis asociada siempre a los folículos de la pluma pero evolucionan hasta dar nódulos de gran extensión donde varios folículos se ven afectados (Figura 3). En los casos más severos estos nódulos se ulceran y es posible



Figura 3: Lesiones cutáneas inducidas por MDV. Lesiones severas generalizadas asociados al folículo plumoso que se detectan tras el desplume de las canales de los pollos de engorde durante el procesado (Foto: Ramírez et al., 2009).

encontrarlos con un aspecto pustuloso. Las regiones que con frecuencia se encuentran más afectadas son la crural externa e interna y cervical dorsal. También es posible observar nódulos tumorales en patas, cresta, y barbillas. Las lesiones cutáneas son importantes para el diagnóstico porque son mucho más frecuentes en casos de MD que en casos de LL. Sin embargo es necesario diferenciarlas de otras lesiones cutáneas como los tumores de células escamosas.

### Lesiones oculares

Las lesiones oculares se han asociado generalmente a la presencia de virus altamente patógeno, sin embargo en condiciones experimentales, virus de cualquier patotipo pueden inducir este tipo de lesiones. Usualmente se encuentra una infiltración del iris por células linfoides que causa una coloración blanquecina del ojo. La pupila es usualmente irregular y no responde a cambios en la intensidad de la luz.

### Lesiones nerviosas

MDV induce lesiones en sistema nervioso central como hipertrofia de los ganglios espinales. Sin embargo, a nivel práctico es bastante infrecuente que se haga la disección de los ganglios espinales y la mayor parte de las veces estas lesiones pasan inadvertidas. Las lesiones que



Figura 4: Lesiones macroscópicas en los nervios periféricos inducidas por MD. Hipertrofia severa del nervio vago. Nótese que los nervios afectados por MD presentan hipertrofia (2 o 3 veces el tamaño de los nervios no afectados), su coloración es amarillenta (debido al edema) y pierden por completo sus estriaciones transversales (Foto: Ramírez et al., 2009).

normalmente se evalúan para el diagnóstico de MD son las lesiones en el sistema nervioso periférico. Cualquier plexo puede estar afectado unilateral o bilateralmente y el grado de afectación de cada plexo varía dentro de un mismo nervio de unas zonas a otras (Figura 4). Por ese motivo se recomienda revisar varios plexos y de forma bilateral. Los plexos nerviosos de mayor accesibilidad son vagos, braquiales y ciáticos.

Cuando los plexos nerviosos están afectados, los nervios se encuentran engrosados y con aspecto edematoso. Además, al tacto se percibe una irregularidad en su forma y se observa una pérdida de su coloración normal que pasa de color perla a grisáceo-amarillento. También es común observar la pérdida de las estriaciones del nervio debido al edema y la infiltración linfoide (Figura 4).

### Criterios patológicos para el diagnóstico de MD: Lesiones histológicas

Las lesiones linfoproliferativas causadas por el MDV se consideran como un combinación de lesiones neoplásicas e inflamatorias. En casos severos es fácil diagnosticar que se trata de lesiones neoplásicas pero hay veces en que es muy difícil determinar si las lesiones son de naturaleza inflamatoria o neoplásica.

Histológicamente, los tumores inducidos por MDV se caracterizan por incluir un infiltrado de células mononucleares muy heterogéneo compuesto fundamentalmente por linfocitos y macrófagos. La presencia de células plasmáticas y heterófilos es muy infrecuente. La naturaleza heterogénea de las células es uno de los criterios que más se utilizan para diferenciar MD de LL. En el caso de LL los tumores son clonales y el aspecto de las células es muy uniforme, todas ellas son linfoblastos poco diferenciados.

Los tumores inducidos por MDV incluyen células neoplásicas y células inflamatorias. Las células neoplásicas son células linfoides de gran tamaño que en muchas ocasiones muestran mitosis aberrantes. Las células inflamatorias incluyen linfocitos de varios tamaños y macrófagos. Tanto las células tumorales como las inflamatorias pueden estar infectadas por el virus. Diversos estudios se han realizado para detectar marcadores de las células tumorales (Burgess et al., 1996; Gimeno et al., 2005a; Witter et al., 1975) pero ninguno es un indicador exclusivo de neoplasia.

### Lesiones tumorales en vísceras

La descripción histopatológica de los linfomas es prácticamente igual a la descrita anteriormente independientemente de la víscera que se encuentre afectada. Los tumores pueden aparecer como nódulos perfectamente

circunscritos o como infiltrados que se extienden por el parénquima provocando la destrucción del mismo.

### Lesiones en sistema nervioso

Sistema nervioso periférico: Los tipos de lesiones existentes (neoplásicas e inflamatorias) descritas anteriormente se hacen mucho más evidentes en los plexos nerviosos (Figura 5). Payne y Biggs, (1967) clasificaron las lesiones en nervios periféricos en tres tipos:

- Lesiones de tipo A: Estas lesiones se caracterizan por un cuadro neoplásico típico con infiltrado masivo de células linfoides y poco componente inflamatorio (Figura 5A). Cuando las lesiones de tipo A están presentes es patognomónico de MD y siempre es criterio diagnóstico.
- Lesiones de tipo B: Estas lesiones se caracterizan por la existencia de edema y el infiltrado de células plasmáticas (Figura 5B). Es también frecuente observar macrófagos y de forma esporádica se pueden encontrar heterófilos. En casos severos también se puede encontrar un proceso de desmielinización secundaria a las lesiones neoplásicas. La patogenia de estas lesiones no es muy clara pero se considera que aparecen como consecuencia de una respuesta inmune a las lesiones tumorales (Payne y Biggs, 1967). Lesiones de tipo B se han descrito también en animales adultos que se exponen por primera vez

al MDV a edades muy tardías (Witter y Gimeno, 2006); y cuando los pollos se exponen a virus recombinantes carentes de la fosfoproteína pp38 (Gimeno et al., 2005b). Las lesiones de tipo B no son criterio diagnóstico de MD porque lesiones muy parecidas se pueden dar en aves con el síndrome de la neuropatía periférica (PN) (Bacon et al., 2001)

- El diagnóstico diferencial entre las MD y PN se hace en función de la epidemiología (PN aparece en pollitas entre 9-11 semanas), las lesiones (PN nunca va acompañada de tumores en vísceras), y el diagnóstico molecular (inmunohistoquímica y real time PCR) (Gimeno et al., 2005a).
- **Lesiones de tipo C:** La naturaleza de estas lesiones está muy poco clara. Payne y Biggs, (1967) las describen como lesiones similares a las tipo B pero mucho menos severas. Posteriormente otros autores las clasifican como lesiones inflamatorias que se pueden dar independientemente de las lesiones de tipo A.

**Sistema nervioso central:** La presentación de lesiones en el encéfalo en el transcurso de la MD ha sido muy discutida desde las primeras publicaciones sobre la misma (Lawn y Watson, 1982; Pappenheimer et al., 1926; Wight, 1962). Sin embargo, se ha demostrado posteriormente que los patotipos de mayor virulencia son capaces de generar lesiones muy severas que se comparan con las descritas en el sistema nervioso peri-

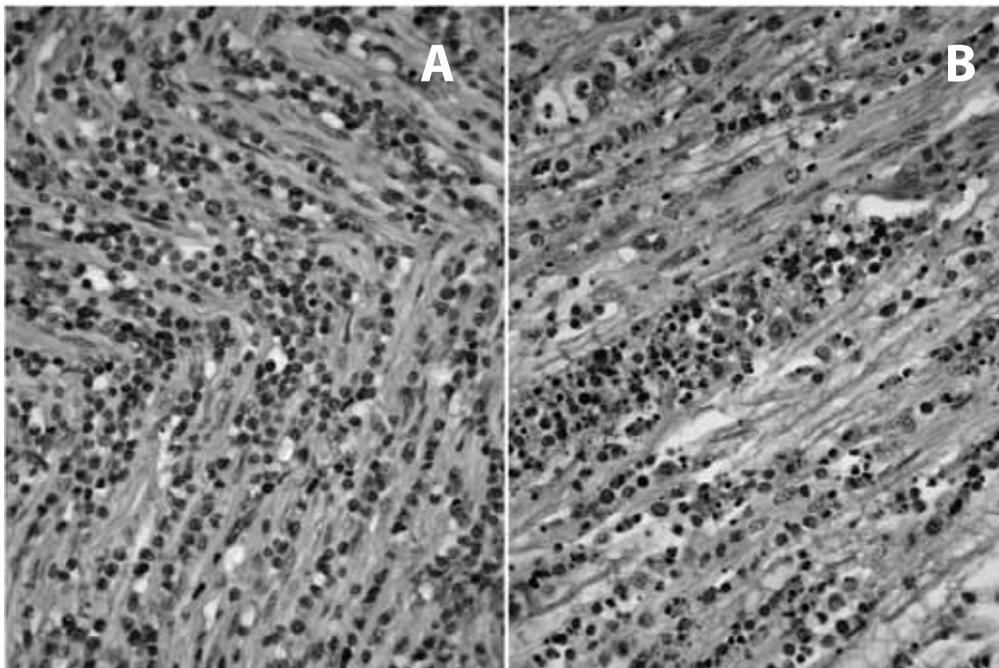


Figura 5: Lesiones histológicas inducidas por MDV en los nervios periféricos. (A) Ejemplo de las lesiones nerviosas de tipo A inducidas por MDV. Las lesiones de tipo A se caracterizan por infiltración moderada a severa de células mononucleares. En los casos más graves, los infiltrados celulares acaban destruyendo la arquitectura del nervio; (B) Ejemplo de las lesiones nerviosas de tipo B inducidas por MDV. Las lesiones de tipo B se caracterizan por la presencia de edema e infiltración de células plasmáticas, macrófagos y heterófilos (Foto: Ramírez et al., 2009).

férico (Cho et al., 1999; Gimeno et al., 2001a; Gimeno et al., 2001b; Gimeno et al., 1999; Witter et al., 1999).

**Globo ocular:** El cambio más constante que se presenta en el globo ocular es el infiltrado mononuclear en el iris, pero este infiltrado puede estar también presente en los músculos del ojo, especialmente en el recto lateral y musculo ciliar.

Otras lesiones menos frecuentes se observan en la cornea (cerca al canal de Schlemm's) conjuntiva, pecten y nervio óptico.

Gimeno et al en 2008 clasificaron las lesiones oculares según su localización y por la severidad en lesiones tempranas (6 a 11 días posteriores a la inoculación) y lesiones tardías (26 a 56 días posteriores a la inoculación). Las lesiones tempranas afectan iris, cuerpo ciliar y capa coroidea y se caracteriza por hipertrofia de células endoteliales, vasculitis e infiltración de linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y heterófilos. Las lesiones tardías consisten en uveítis linfocítica severa, queratitis, pectenitis, vitreítis, retinitis y necrosis de la retina que varía de segmentada a difusa. La infiltración celular incluye macrófagos, granulocitos, células plasmáticas y células CD4 y CD8 de varios tamaños.

**Tegumento:** Las lesiones cutáneas como en los casos anteriores resultan de una combinación entre lesiones neoplásicas e inflamatorias, no obstante las lesiones que suelen predominar poseen un componente inflamatorio. Generalmente la estructura del tegumento se mantiene y lo único que se puede apreciar son infiltrados mononucleares, generalmente inflamatorios, en torno a los folículos de las plumas. Sin embargo en algunos casos se observan lesiones neoplásicas típicas en la dermis que pueden alcanzar un gran tamaño provocando la ruptura de la estructura de la piel formando úlceras. Esto

es más frecuente en el tegumento de cresta y barbillas que en otras zonas pero también se puede observar en la piel de los tarsos. Lesiones similares a las observadas en los nervios se producen en la pulpa de las plumas y puede servir como método de diagnóstico antemortem (Moriguchi et al., 1989). Sin embargo, la validez de este método como diagnóstico está aún por estudiar.

## Métodos diagnósticos avanzados

**Inmunohistoquímica:** Las técnicas de inmunohistoquímica tienen gran utilidad para el diagnóstico de MD y pueden ser utilizadas para la caracterización fenotípica de los tumores y para estudiar la expresión del oncogén meq (Figura 6).

**Caracterización fenotípica de los tumores:** Los tumores de MD son mezclas de células transformadas e inflamatorias. En los tumores producidos por MD se observa principalmente transformación de células T, mientras que en tumores inducidos por la Leucosis linfocítica (LL), se observa fundamentalmente transformación de células B. Tradicionalmente se ha utilizado la tinción de metil verde pironina para diferenciar entre células B (que tiñen en rojo debido a la alta concentración de ARN) y células T. En la actualidad se pueden utilizar anticuerpos monoclonales específicos para células T y células B que se pueden conseguir comercialmente (Figura 6B). Desafortunadamente, aunque estas técnicas pueden confirmar el diagnóstico en un alto porcentaje de casos no se ofrecen como diagnóstico para MD en muchos laboratorios.

Otros marcadores celulares como MATSA y AV37, en un principio fueron considerados de valor diagnóstico para MD (Burgess y Davison, 2002; Burgess et al.,

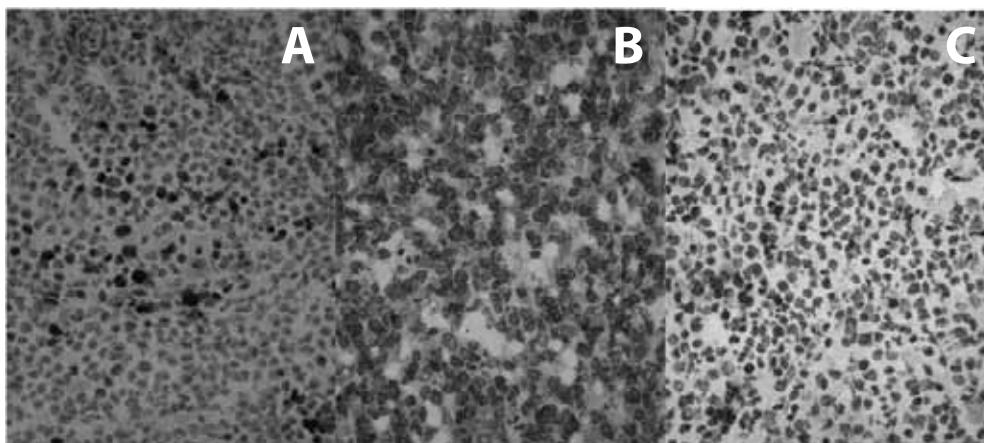


Figura 6: Caracterización fenotípica de los tumores inducidos por MDV mediante inmunohistoquímica. (A) Expresión del oncogén meq en un tumor inducido por MDV. Nótese que el antígeno meq del MDV se expresa en los núcleos, nucléolos y cuerpos de Cajal; (B) Expresión del antígeno celular CD4 en un tumor inducido por MDV. Nótese que la mayor parte de las células constituyentes del tumor son linfocitos CD4+; (C) Expresión del antígeno celular CD8 en un tumor inducido por MDV. Nótese que muy pocas células en el tumor son linfocitos CD8+ (Foto: Ramírez et al., 2009).

2001; Witter et al., 1975), pero actualmente se sabe que no son marcadores tumorales y pueden aparecer en linfocitos activados (MATSA) y en tumores de LL para AV37 (Gimeno et al., 2005a).

**Expresión del oncogén meq.** El MDV codifica un antígeno meq, comúnmente expresado por células tumorales de MD (Ross et al., 1997) y no ha sido encontrado en otros tumores aún cuando la infección de MDV está de forma latente (Gimeno et al., 2005a) (Figura 6A). Aunque meq puede estar presente en tejidos productivamente infectados con MDV, como el epitelio de los folículos de las plumas o los órganos linfoides, la expresión de meq durante la infección citolítica es mucho menor que en células transformadas. El antígeno meq no se puede conseguir en forma comercial, y por tanto es una técnica que no se puede realizar en todos los laboratorios.

**PCR en tiempo real:** La cuantificación del genoma de MDV en tumores permite determinar si un tumor está producido por MD. Se ha demostrado que los linfomas inducidos por MDV poseen muchas más copias del genoma de MDV que los tejidos que están latentemente infectados con el virus (Gimeno et al., 2005a). Esta técnica nos permite no solo proveer discriminar entre MD y tumores inducidos por retrovirus, sino que también nos permite un diagnóstico precoz de la enfermedad (Gimeno et al., 2008).

**Southern blot y PCR para retrovirus:** El único método diagnóstico para determinar si un retrovirus es responsable del desarrollo de LL es detectar la inserción del genoma del retrovirus en las proximidades del oncogén celular c-myc (Ewert, 1997). Existen dos técnicas para detectar el lugar de inserción del virus: Southern blot y PCR. Lamentablemente ninguna de estas técnicas se ha utilizado extensamente para diagnóstico y en la actualidad existen pocos laboratorios que tengan la capacidad de realizarlas.

**Aislamiento de retrovirus:** el aislamiento de los retrovirus no debe tenerse en cuenta como un criterio diagnóstico para el desarrollo de tumores de MD, pero permite determinar si un lote está contaminado con retrovirus, cuando todos los lotes deben ser libres teniendo así repercusiones legales. Para el aislamiento del virus de la leucosis aviar se necesita crecer el virus en células de la línea 0, que no permite el crecimiento de virus endógenos. Además se debe cambiar el medio de cultivo a las 24 horas para asegurar que los virus endógenos presentes en el inóculo han desaparecido del cultivo.

**Otras técnicas de diagnóstico virológico para MDV.** El aislamiento de MDV en cultivos celulares, su detección por PCR convencional, secuenciación parcial o total del genoma del virus, o la detección en los tejidos de antígenos del virus (diferentes al oncogén meq) son

evidencias de la infección con MDV pero no criterios de diagnóstico de la enfermedad. De ninguna manera se puede confirmar un diagnóstico de MD en base a cualquiera de estas técnicas.

## Diagnóstico precoz de la enfermedad de Marek

El diagnóstico de MD normalmente se hace una vez que los lotes han empezado a desarrollar tumores o muestran signos neurológicos. Sin embargo, gracias al desarrollo de las técnicas moleculares y a un mejor conocimiento sobre la patogenia de MDV es posible hacer un diagnóstico precoz de MD. El diagnóstico precoz de la MD se realiza mediante la medición en sangre o en pulpa de las plumas de la cantidad del genoma viral del virus de campo mediante real time PCR (Gimeno et al., 2008; Gimeno et al., 2004; Islam et al., 2006). Aunque el desarrollo de tumores macroscópicos tarda varias semanas en producirse y es bastante infrecuente detectar tumores macroscópicos antes de las 6-7 semanas en el campo, los tumores microscópicos se desarrollan mucho antes. Los animales que ya han desarrollado tumores microscópicos tienen mayor cantidad del virus en sangre periférica y en la pulpa de la pluma que los animales que no desarrollan tumores incluso a las 2-3 semanas del desafío (Gimeno et al., 2008). El diagnóstico precoz puede ser de gran utilidad en el caso del pollo de carne para decidir la fecha de sacrificio o incluso en pollitas de levante para predecir si se van a dar problemas de MD durante la puesta.

## Tipo de muestras necesarias para el diagnóstico de la Enfermedad de Marek

Para un diagnóstico adecuado de MD es necesario que se tome en consideración dos aspectos fundamentales: la selección y la toma de muestras y la preservación de las muestras hasta que lleguen al laboratorio. El tipo de muestra y la forma de preservación depende de la técnica que se quiera realizar como detallamos a continuación.

**Histopatología:** Las muestras a tomar deben incluir tumores y nervios periféricos fijados en formalina al 10%. Es recomendable tomar las muestras de animales que se hayan sacrificado en ese momento. No se deben tomar muestras de animales que estén muertos y que se desconozca cuanto tiempo ha pasado desde que murieron.

**Inmunohistoquímica:** Las muestras de tejido tumoral o los nervios hipertrofiados deben ser congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -70 grados Celsius. Los bloques de tejidos congelados se deben mandar congelados en nieve carbónica para asegurar que no se descongelan durante el transporte.

PCR en tiempo real (real time PCR): La técnica se puede realizar a partir de ADN extraído de tumores nodulares, de muestras de sangre tomadas en EDTA o de pulpa de las plumas. Las muestras pueden mantenerse en refrigeración si el transporte al laboratorio se realiza en menos de 8 horas. De no poder ser así deberán ser congeladas y enviadas con hielo seco al laboratorio.

De gran utilidad para la toma de muestras y el transporte son las tarjetas Flinders Technology Associates (FTA). Recientemente, se ha demostrado que las muestras de tumores, sangre y pulpa de las plumas pueden tomarse en tarjetas FTA, mantenerse incluso por varios meses en temperatura ambiente y mandarse por correo ordinario al laboratorio (Cortes et al., 2008).

Southern blot: Se debe enviar material obtenido por biopsia, necropsia o muestras citológicas en refrigeración si el traslado al laboratorio no supera las 8 horas, de lo contrario se deben congelar y enviar con hielo seco.

Aislamiento viral: Para el aislamiento de ALV o REV se pueden mandar muestras de plasma o suero mantenidas en refrigeración o congeladas.

Para el aislamiento de MDV (aunque como ya hemos mencionado no tiene valor diagnóstico) las muestras de elección son animales vivos. Cuando esto no es posible, y siempre que se puedan mandar las muestras en menos de 24 horas, se puede intentar el aislamiento de muestras de sangre tomadas en heparina. En caso de no poder enviar animales vivos o mandar muestras de sangre es posible mandar leucocitos congelados en nitrógeno líquido y mantenidos en nieve carbónica durante el transporte.

## Conclusión y consideraciones futuras

El diagnóstico de MD en la práctica es mucho más complicado de lo que se considera, debido a que no existe una lesión patognomónica real. Es de gran importancia entender que infección por MDV y enfermedad de MD son totalmente diferentes. El aislamiento de MDV no significa que una animal tenga o vaya a desarrollar MD.

El diagnóstico de MD debe hacerse en forma secuencial como un proceso ordenado, una sola prueba diagnóstica por sí sola no es definitiva para emitir un diagnóstico acertado. En esta monografía hemos revisado los métodos de diagnóstico que están disponibles en la actualidad. A medida que la patogenia de las enfermedades se conoce mejor y las técnicas moleculares avanzan es posible que en un futuro se desarrollen nuevos métodos que faciliten el diagnóstico diferencial de las enfermedades neoplásicas.

## Agradecimientos

Queremos expresar nuestros más sinceros agradecimientos a la Doctora Aneg Lucia Cortés, por compartir sus conocimientos, pieza fundamental en el proceso de aprendizaje y comprensión de las pruebas diagnósticas para MD; a nuestras compañías Incuavícola Quindío S.A y Universal Avícola & CIA S en C por proporcionarnos el tiempo requerido para la realización de este trabajo, además del apoyo económico y a la Universidad del Tolima por su acompañamiento en este proceso.

## Referencias

- 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.* 1997. 41, 947-956.
- Bacon LD, Witter RL, Silva RF. Characterization and experimental reproduction of peripheral neuropathy in White Leghorn chickens. *Avian Pathol.* 2001. 30, 487-499.
- Baigent S, Smith L, Currie R, Nair V. Correlation of MDV vaccine virus genome load in feather tips with protection, using an experimental challenge model. *Avian Pathology* 2007. 36.
- Biggs PM, Payne LN. Studies on Marek's disease. I. Experimental transmission. *J.Natl.Cancer Inst.* 1967. 39, 267-280.
- Bülow VV, Biggs PM. Differentiation between strains of Marek's disease virus and turkey herpesvirus by immunofluorescence assays. *Avian Pathol.* 1975. 4, 133-146.
- Bülow VV, Biggs PM, Frazier JA. Characterization of a new serotype of Marek's disease herpesviruses, In: de-The, G., al, e. (Eds.) *Onco-genesis and Herpesviruses II.* IARC Scientific Publications, Lyon, 1975. pp. 317-328.
- Burgess SC, Davison TF. Identification of the neoplastically transformed cells in Marek's disease herpesvirus-induced lymphomas: Recognition by the monoclonal antibody AV37. *Journal of Virology* 2002. 76, 7277-7292.
- Burgess SC, Kaiser P, Davison TF. A novel lymphoblastoid surface antigen and its role in Marek's disease (MD), In: Silva, R.F., Cheng, H.H., Coussens, P.M., Lee, L.F., Velicer, L.F. (Eds.) *Current Research on Marek's Disease.* American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA, 1996. pp. 29-39.
- Burgess SC, Kaiser P, Davison TF. A monoclonal antibody that recognizes the chicken homologue of CD30, a tumor antigen in Marek's disease. *Current Progress in Avian Immunology.* 2001.
- Calnek BW, Schat KA, Ross LNJ, Shek WR, Chen CLH. Further characterization of Marek's disease virus infected lymphocytes. I. In vivo infection. *Intl.J.Cance.* 1984.r 33, 389-398.
- Calnek BW, Ubertaini T, Adldinger HK. Viral antigen, virus particles, and infectivity of tissues from chickens with Marek's disease. *J.Natl. Cancer Inst.* 1970. 45, 341-351.
- Cho BR, Balch RK, Hill RW., Marek's disease vaccine breaks: Differences in viremia of vaccinated chickens between those with and without Marek's disease. *Avian Dis.* 1976. 20, 496-503.
- Cho KO, Endoh D, Onuma M, Itakura C. Analysis of transcriptional and translational activities of Marek's disease (MD) virus genes in MD central nervous system lesions in chickens. *Avian Pathology.* 1999. 28, 47-53.
- Churchill AE, Biggs PM. Herpes-type virus isolated in cell culture from tumors of chickens with Marek's disease. II. Studies in vivo. *J.Natl.Cancer Inst* 1968-. 41, 951-956.
- Churchill AE, Payne LN, Chubb RC. Immunization against Marek's disease using a live attenuated virus. *Nature.* 1969. 221, 744-747.
- Cortes AL, Montiel ER, Gimeno IM. Diagnosis of Marek's disease by real time PCR from samples collected on FTA® cards. In: 145th Annual Convention of the American Veterinary Medical Association, New Orleans, LA.. 2008.
- Cui Z, Zngang Z, Jiang S, Zhou J. Reticuloendotheliosis viruses and Marek's disease were often isolated simultaneously from chicken flocks vaccinated with CVI/988 Rispens and having late Marek's disease tumor outbreaks. In: XIII Congress of the World Veterinary Poultry Association, Denver, 20003. p. 144.
- Ewert DL. Molecular Approaches for the Diagnosis of Avian Lymphomas, In: Fadly, A.M., Schat, K.A., Spencer, J.L. (Eds.) *Diagnosis and control of neoplastic diseases of poultry.* American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, 1997. pp. 12-18.
- Gimeno IM, Cortes AL, Silva RF. Load of Challenge Marek's Disease Virus DNA in Blood as a Criterion for Early Diagnosis of Marek's Disease Tumors. *Avian Diseases* 2008. 52, 203-208.
- Gimeno IM, Witter RL, Fadly AM, Silva RF. Novel criteria for the diagnosis of Marek's disease virus-induced lymphomas. *Avian Pathology.* 2005a .34, 332-340.
- Gimeno IM, Witter RL, Hunt HD, Lee LF, Reddy SM, Neumann U. Marek's disease virus infection in the brain: virus replication, cellular infiltration and major histocompatibility complex antigen expression. *Veterinary Pathology.* 2001 a. 38, 491-503.
- Gimeno IM, Witter RL, Hunt HD, Reddy SM, Lee LF, Silva RF. The pp38 gene of Marek's disease virus (MDV) is necessary for cytolytic infection of B cells and maintenance of the transformed state but not for cytolytic infection of the feather follicle epithelium and horizontal spread of MDV. *Journal of Virology.* 2005 b. 79, 4545-4549.
- Gimeno IM, Witter RL, Hunt HD, Reddy SM, Reed WM. Biological and immunological characteristics shared by highly protective vaccines against Marek's disease. *Avian Pathology.* 2004, 33: 59-68.
- Gimeno IM, Witter RL, Hunt HD, Reddy SM, Neumann U. Differential attenuation of the induction by Marek's disease virus of transient paralysis and persistent neurological disease: a model for pathogenesis studies. *Avian Pathol.* 2001 b.30, 397-409.
- Gimeno IM, Witter RL, Reed WM. Four distinct neurologic syndromes in Marek's disease: Effect of viral strain and pathotype. *Avian Diseases.* 1999. 43, 721-737.
- Goodwin MA, Hafner S. Multicentric histiocytosis mimicking reticuloendotheliosis in broilers. *Proc.29th Nat.Mtg.Poult.Health & Processing,* 1994. 56-56.
- Hafner S, Goodwin MA, Kelley LC, Bounous DI, Piette M, Steffens WB, Langheinrich KA, Brown J. Multicentric histiocytosis mimicking reticuloendotheliosis in broiler chickens. *Proc.66th NE Conf.Avian Dis.* 1994. 26-26.
- Islam AF, Walkden-brown SW, Islam A, Underwood GJ, Groves PJ. Relationship between Marek's disease virus load in peripheral blood lymphocytes at various stages of infection and clinical Marek's disease in broiler chickens. *Avian Pathology.* 2006. 35, 42-48.
- Jones D, Lee LF, Liu JL, Kunng HJ, Tillotson JK. Marek disease virus encodes a basic-Leucine zipper gene resembling the fos/jun oncogenes that is highly expressed in lymphoblastoid tumors. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA.* 1992. 89, 4042-4046.
- Keager K. Marek's Disease: Clinical Aspects and Current Field Problems in Layer Chickens, In: Fadly, A.M., Schat, K.A., Spencer, J.L. (Eds.) *Diagnosis and control of neoplastic diseases of poultry.* American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, 1997. PA, pp. 23-26.
- Lawn AM, Watson JS. Ultrastructure of the central nervous system in Marek's disease and the effect of route of infection on lesion incidence in the central nervous system. *Avian Pathol.* 1982. 11, 213-225.

- Ma J. Multiple Nervenentzündung (Polyneuritis) bei Hühnern. Deut. Tierarztl. Woch. 1907. 15, 417-421.
- Moriguchi R, Oshima M, Mori, F, Umezawa I, Itakura C. Chronological change of feather pulp lesions during the course of Marek's disease virus-induced lymphoma formation in field chickens, In: Kato, S., Horiuchi, T., Mikami, T., Hirai, K. (Eds.) Advances in Marek's disease research. Japanes Association on Marek's Disease, Osaka, Japan, 1989. pp. 338-343.
- Nazerian K. Electron microscopy of a herpesvirus isolated from Marek's disease in duck and chicken embryo fibroblast cultures. Proc. Electron Micro.Soc.America, 1968. 222-223.
- Nicholls TJ. Marek's disease in sixty-week-old laying chickens. Aust. Vet.J. 1984. 61, 243-243.
- Okazaki W, Purchase HG, Burmester BR. Vaccination against Marek's disease: Possible causes of failure of herpesvirus of turkeys (Strain FC126) to protect chickens against Marek's disease. Amer.J.Vet.Res. 1973. 34, 813-817.
- Osterrieder N, Vautherot JF. The genome content of Marek's disease-like viruses, In: Davison, F., Nair, V. (Eds.) Marek's disease: an evolving problem. Elsevier, Compton, 2004. pp. 17-29.
- Pandiri AR, Gimeno IM, Reed WM, itzgerald SD, Fadly AM. Subgroup J avian leukosis virus-induced histiocytic sarcomatosis occurs only in persistently viremic but not immunotolerized meat-type chickens. Veterinary Pathology. 2009. 46, 282-287.
- Pappenheimer AM, Dunn LC, Cone V. A study of fowl paralysis: Neuro-lymphomatosis gallinarum. Storrs Agr.Exp.Sta. 1926. 143, 187-290.
- Payne LN, Biggs PM. Studies on Marek's disease. II. Pathogenesis. J.Natl.Cancer Inst. 1967. 39, 281-302.
- Rispens BH, Van Vloten J, Mastenbroek N, Mass HJL, Hendrick JL. Control of Marek's disease in the Netherlands. II. Field trials on vaccination with an avirulent strain (CVI 988) of Marek's disease virus. Avian Dis. 1972. 16, 126-138.
- Ross LJN, O'sullivan G, Rothwell C, Smith G, Rennie M, Lee LF, Davison, F. MEQ and a small RNA antisense to ICP4 are abundantly expressed in CD4 cells and cells carrying a novel lymphoid marker, AV37, in Marek's Disease Lymphomas. J.Gen.Virol. 1997.
- Schat KA. Immune responses against Marek's disease virus, In: 4th International Symposium on Marek's Disease, 19th World's Poultry Congress, Vol. 1. World's Poultry Science Assn., Amsterdam, 1992. pp. 233-238.
- Wight PAL. The histopathology of the central nervous system in fowl paralysis. J.Comp.Pathol. 1962.72, 348-359.
- Witter RL. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. Avian Dis. 1967. 41, 149-163.
- Witter RL, Gimeno IM. Susceptibility of adult chickens, with and without prior vaccination, to challenge with Marek's disease virus. Avian Diseases. 2006. 50, 354-365.
- Witter RL, Gimeno IM, Fadly AM. Differential diagnosis of tumor diseases in poultry. In AAAP slides study set (American Association of Poultry Veterinarians). 2003.
- Witter RL, Gimeno IM, Reed WM, Bacon LD. An acute form of transient paralysis induced by highly virulent strains of Marek's disease virus. Avian Dis. 1999. 43, 704-720.
- Witter RL, Nazerian K, Purchase HG, Burgoyne GH. Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus. Amer.J.Vet.Res. 1970. 31, 525-538.
- Witter RL, Stephens EA, Sharma JM, Nazerian K. Demonstration of a tumor-associated surface antigen in Marek's disease. J.Immunol. 1975. 115, 177-183. 