

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

Presencia de los Virus de la Enfermedad de Marek y Anemia Infecciosa Aviar en aves de levante del norte y oriente del departamento de Antioquia

Propuesta de trabajo de grado para el título de Maestría en Ciencias Veterinarias, línea de investigación en enfermedades infecciosas. FCA. UdeA

Sara López Osorio (i)

6/12/2015

Comité tutorial: Jenny Jovanna Chaparro MV. MSc. Dr.Sc

Diego Piedrahita MVZ. MSc. PhD.

Gloria Consuelo Ramírez Nieto. MV. MSc. PhD.

Tabla de contenido

1.1	Título	10
1.2	Identificación del Estudiante.....	10
1.3	Comité tutorial.....	10
1.4	Grupo de investigación.....	10
1.5	Categoría del grupo de investigación	10
1.6	Duración de la propuesta.....	10
1.7	Valor Total de la Propuesta	10
1.8	Fuentes de financiación:	10
1.	Prefacio.....	11
2.	Agradecimientos	16
3.	Resumen	16
4.	Summary.	17
5.	Introducción general	18
6.	Objetivos.....	21
a.	Objetivo general	21
b.	Objetivos específicos.....	21
	Capítulo 1: Marco teórico	22
1.1	Anemia Infecciosa Aviar (CIAV): Revisión	22
1.1.1	Introducción	22
1.1.2	Características del virus.....	24
1.1.3	Transmisión del CIAV	26
1.1.4	Patogénesis	27
1.1.5	Signos clínicos	31
1.1.6	Diagnóstico	33
1.1.7	Epidemiología.	36
1.1.8	Coinfección	38

1.2 Virus de la Enfermedad de Marek	40
1.2.1 Introducción	40
1.2.2 Características del MDV	41
1.2.3 Transmisión	44
1.2.4 Patogénesis	46
Fase 1: Citolítica temprana	46
Fase 2: Latencia	47
Fase 3: Infección productiva-restrictiva.....	47
Fase 4: Oncogénesis	48
1.2.5 Signos clínicos	50
1.2.6 Diagnóstico	52
1.2.7 Epidemiología	58
1.2.8 Vacunación	58
Capítulo 2: Muestreo y preparación de las muestras.	61
2.1 Introducción	61
2.2 Metodología	62
2.2.1 Zona de estudio.....	62
2.2.2 Población y tamaño de muestra	62
2.2.3 Cálculo del tamaño de la muestra.....	64
2.2.4 Toma de muestra	65
2.2.5 Extracción de DNA.....	66
2.2.6 Condiciones PCR estándar para gen de referencia.....	67
2.2.7 Electroforesis	67
2.2.8 Preparación del BSA	68
2.3. Resultados.....	68
2.3.1 Cantidad de DNA de las muestras	68
2.3.2 Calidad de DNA de las muestras.	68
2.4 Discusión.	69
2.5 Conclusiones.	70

Capítulo 3: Estandarización de cultivos Primarios de Embrión de Pollo.	71
3.1 Introducción.....	71
3.2 Metodología.....	72
3.2.1 Cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo.	72
3.2.2 Cultivo primario de riñón, hígado y bursa de embrión de pollo.	73
3.2.3 Descripción morfológica.....	73
3.3 Resultados y discusión.....	74
<i>a. Fibroblasto de embrión de pollo (FEB)</i>	74
<i>b. Células de riñón de embrión de pollo.</i>	75
<i>c. Células de Hígado de embrión de pollo.</i>	77
<i>d. Células de Bursa de embrión de pollo.</i>	77
3.4 Conclusiones.....	78
3.5 Agradecimientos.....	79
Capítulo 4: Caracterización molecular del Virus de la Enfermedad de Marek en muestras de sangre y pluma de aves de levante de postura comercial en Colombia.	80
4.1 Introducción.....	80
4.2 Metodología.....	82
4.2.1 Material biológico.....	82
<i>a. Virus</i>	82
<i>b. Estándares de DNA (FEP)</i>	82
4.2.2 PCR convencional.....	82
<i>a. Serotipo 3 (MeHV-1)</i>	82
<i>b. Serotipo 2 (GaHV-3)</i>	83
<i>c. Serotipo 1 (GaHV-2)</i>	83
4.2.3 Electroforesis.....	85
4.2.4 Extracción y purificación de producto de PCR a partir de gel de Agarosa.....	85
4.2.5 Secuenciación.....	85

4.2.6 Ensamblaje	86
4.2.7 PCR en tiempo real (rtPCR)	86
a. Extracción de DNA a partir de tarjetas FTA.	87
b. Control endógeno de la rtPCR:.....	87
c. Iniciadores.....	88
d. Condiciones rtPCR	89
e. Análisis.....	89
4.2.8 Intento de aislamiento.....	90
<i>a. Preparación del inóculo.</i>	90
<i>b. Inoculación en cultivo primario</i>	91
4.3 Resultados.....	91
4.3.1 El MDV circula en sangre durante todo el levante.	91
4.3.2 El MDV es eliminado en pluma en mayor cantidad a los 30 días.	95
4.3.3. EL número de bandas en la PCR del segmento BAMH sugiere que en las granjas circulan varias cepas.	98
4.3.4 Mutaciones en el gen <i>Meq</i> sugieren que se tratan de cepas atenuadas de GaHV-2	100
4.3.5 Efecto citopático en FEP compatible con GaHV-2.....	104
4.3 Discusión	105
4.4 Conclusiones.....	110
Capítulo 5: Presencia del virus de la anemia infecciosa aviar determinada mediante PCR y su caracterización molecular por RFLP en aves de postura de algunas granjas del norte y oriente del departamento de Antioquia.....	111
5.1 Introducción.....	111
5.2 Metodología.....	112
5.2.1 Material biológico	112
<i>Virus</i>	113
5.2.2 Extracción de DNA.....	113
5.2.3 PCR convencional	113

5.2.4 Análisis por endonucleasas de restricción	114
5.3 Resultados.....	114
5.3.1 Presencia del CIAV en las granjas evaluadas durante su etapa de levante	114
5.3.2 Estandarización de la RFLP con cepa control	116
5.3.3 Coinfección con el Virus de la enfermedad de Marek.....	117
5.4 Discusión	117
5.5 Perspectivas.....	119
Capítulo 6: Publicación en Revista Plumazos # 51. 2015. AMEVEA Colombia.	
.....	121
La inmunodepresión subclínica- Un problema importante en los sistemas de producción avícola	121
6.1 Introducción.....	122
6.2 Metodología.....	125
a. Población y tamaño de muestra.....	125
b. Muestreo	126
c. Histopatología	126
6.3 Resultados y discusión.....	127
6.3.3 Hallazgos histopatológicos en tejido de timo	132
6.4 Conclusiones.....	134
Capítulo 7: Characterization of Marek's Disease Virus in a layer farm from Colombia.	137
7.1 Summary.....	137
7.2 Resumen.....	138
7.3 Introduction.....	140
7.4 Materials and methods	142
7.4.1 Sample collection.....	142
7.4.2 Histopathology and immunohistochemistry.....	142
7.4.3 DNA extraction.....	143

7.4.4 PCR amplification of MDV genes.....	144
7.4.5 Pathotype analysis by PCR.	146
7.4.6 Sequencing and phylogenetic analysis.	146
7.4.7 Real - Time PCR.....	146
7.4.8 Viral Isolation.	147
7.5 Results	148
7.5.1 The histopathological lesions are compatible with Marek's Disease.	149
7.5.2 Genomic amplification of the 3 serotypes of MDV.	151
7.5.3 The GaHV-2 strain is highly virulent according to its repeating pattern of 132 bp.....	154
7.5.4 <i>Meq</i> gene mutations confirm the presence of a highly virulent strain (vv+MDV).....	154
7.5.5 The UdeA-2013CO was clustered with vv+ MDV strains.....	156
7.5.6 The cytophatic effect in cell culture is characteristic of MDV GaHV-2.	158
7.6 Discussion	158
9. References.....	167

Índice de tablas

Tabla 1: Información de las granjas muestreadas.....	65
Tabla 2: Iniciadores para gen de Referencia.....	67
Tabla 3: Panel de imágenes de FEP.....	75
Tabla 4: Panel de imágenes de Células de embrión de pollo.....	76
Tabla 5: Resumen de iniciadores para PCR de MDV.	84
Tabla 6: <i>Iniciadores</i> y sondas utilizados en la rtPCR y PCR	88
Tabla 7: Promedio de cuantificación del MDV en sangre.....	92

Tabla 8. Panel de Gráficas con la Curva estándar de la q PCR de GaHV-2 (MDV1 <i>Meq</i> gene), GaHV-3 (MDV2 SB1), MeHV-1 (HVT sORF 1) y Ovo gene.	94
Tabla 9: Cuantificación del MDV en <i>pool</i> de pluma.....	96
Tabla 10: Cepas con porcentaje de identidad para las muestras secuenciadas.	100
Tabla 11: Alineación de secuencia de aminoácidos deducidos de la proteína <i>Meq</i>	101
Tabla 12. Panel de Imágenes de FEP inoculadas con muestras de bazo.	104
Tabla 13: Grado de lesión a nivel microscópico en la bursa de Fabricio.....	131
Tabla 14 Primers for PCR and rtPCR detection of the three MDV serotypes.	145
Tabla 15. Histological findings in birds with clinical signs of Marek's Disease.	150
Tabla 16 Comparative results between standard PCR and rtPCR.	153
Tabla 17. Amino acid substitution in the <i>Meq</i> protein of GaHV-2 strains.....	155

Índice de imágenes

Imagen 1: Electroforesis del producto de PCR H3 y H8 (Gen de referencia) de algunas de las muestras.	69
Imagen 2: Productos de amplificación de la PCR 132 pb. Control positivo cepa <i>Rispens</i> (8 repeticiones).....	99
Imagen 3: Gel Agarosa 1%. Productos de amplificación de la PCR 132 pb.. ..	99
Imagen 4: PCR para VP2.....	115
Imagen 5: Digestión del control positivo con 6 enzimas.....	116
Imagen 6: Corte histológico de Bazo.....	129
Imagen 7: Corte histológico de Bursa de Fabricio.....	132
Imagen 8: corte histológico de Timo.....	134
Image 9. Lymphoid infiltrate in sciatic nerve of a bird with clinical signs of MDV in different magnification.	150

Image 10. A. Section of thymus from a laying hen with clinical signs of MDV from Colombia.....	151
Image 11. PCR amplification of the <i>Meq</i> gene from MDV clinical case of this study.....	152
Image 12. Phylogenetic relationships between 41 GaHV-2 strains based on <i>Meq</i> gene sequences.	157
Image 13. Virus isolation in chicken embryo fibroblast.....	158

Índice de Gráficas

Gráfica 1: Curva de crecimiento FEB.	74
Gráfica 2: Curva de Crecimiento para células de Hígado, Bursa y Riñón de embrión de pollo..	78
Gráfica 3: Resultados por PCR para MDV MeHV-1 (serotipo 3), GaHV-2 (Serotipo 1) y GaHV-3 (serotipo 2) en sangre en las diferentes edades.....	92
Gráfica 4: Resultados de rtPCR para GaHV-2 (<i>Meq</i> Gen) y MeHV-1 en muestras de sangre.....	95
Gráfica 5: Resultados por PCR para MDV MeHV-1 (serotipo 3), GaHV-2 (Serotipo 1) y GaHV-3 (serotipo 2) en <i>pool</i> es pluma en las diferentes edades.	96
Gráfica 6: Resultados de rtPCR para GaHV-2 (<i>Meq</i> Gen) y MeHV-1 en muestras de pluma	97
Gráfica 7: Resultados de rtPCR para GaHV-3 (<i>DNA pol</i> gen) en muestras de <i>pool</i> de pluma	98
Gráfica 8: Dinámica de positividad por PCR para CIAV. BY: aves de traspatio.	115
Gráfica 9: Porcentaje global de Positividad para gen VP2 (A) y VP1 (B) en las muestras de sangre.....	116
Gráfica 10. Porcentaje de coinfección con CIAV y MDV (GaHV-2).	117
Gráfica 11: Porcentaje de tejido (bazo) con clasificación histopatológica en escala nominal durante la etapa de levante.....	128

Gráfica 12: Porcentaje de tejido (bursa) con clasificación histopatológica en escala nominal durante la etapa de levante.....	130
Gráfica 13: Porcentaje de tejido (timo) con clasificación histopatológica en escala nominal durante la etapa de levante.....	133

Índice de ilustraciones

Ilustración 1: Estructura del virion del género <i>Gyrovirus</i>	24
Ilustración 2: Sitios de corte y fragmentos generados por enzimas de restricción en VP1.	36
Ilustración 3: Estructura del virión género <i>Mardivirus</i>	42
Ilustración 4: Esquema de evolución del MDV.	44
Ilustración 5. Árbol Filogenético para cepas MDV.....	103
Ilustración 6: Causas de inmunosupresión en aves.	124

Información General

1.1 Título

Presencia de los Virus de la Enfermedad de Marek y Anemia Infecciosa Aviar en aves de levante del norte y oriente del departamento de Antioquia.

1.2 Identificación del Estudiante

- Nombre: Sara López Osorio.
- Cédula: 1.128.422.372
- Programa: Maestría en Ciencias Veterinarias.
- Línea de investigación: Enfermedades infecciosas.

1.3 Comité tutorial

- Directora: Jenny Jovana Chaparro Gutiérrez. MV. MSc. DrSc. Universidad de Antioquia. Correo: jenny.chaparro@udea.edu.co
- Miembros del comité:
 - a. Diego Piedrahita. MVZ, MSc, PhD. Universidad de Antioquia
 - b. Gloria Consuelo Ramírez Nieto. MV MSc, PhD. Universidad Nacional de Colombia.

1.4 Grupo de investigación

Grupo de investigación en Ciencias Veterinarias: CENTAURO.

1.5 Categoría del grupo de investigación

Categoría A1

1.6 Duración de la propuesta

18 meses

1.7 Valor Total de la Propuesta

\$87.300.000,00

1.8 Fuentes de financiación:

Colciencias¹, AMEVEA² y UdeA.

¹ Programa Joven investigador Colciencias y Proyecto Marek Colciencias: Código 111552128321. Contrato 0155 – 2012

1. Prefacio

Parte de mi práctica profesional de pregrado en Medicina Veterinaria fue en una granja avícola de postura, en donde descubrí mi pasión por la medicina aviar y me brindó bases que más adelante utilizaría como profesional para la asesoría de granjas avícolas comerciales. Durante el tiempo que me dediqué a la clínica, evidencié falta de información sobre enfermedades inmunosupresoras en aves, ya que éstas no hacen parte del control oficial, y por lo tanto pasan en su mayoría desapercibidas, o no se reportan, generando así un vacío en la disponibilidad de datos. Es claro que sin un buen desarrollo del sistema inmune, el desempeño del ave nunca llegará al potencial de su línea genética y además, permitirá la proliferación de patógenos oportunistas y fallas en la respuesta a la vacunación, generando así pérdidas económicas significativas en la producción avícola de Colombia.

Este trabajo de grado se presenta como parte de los requisitos para optar al grado académico de Magister en Ciencias Veterinarias, Línea de Enfermedades Infecciosas, de la Universidad de Antioquia y no ha sido presentada con anterioridad para obtener algún otro título en esta institución u otra. Contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el laboratorio de Parasitología y Microbiología Veterinaria, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia, durante el período de tiempo comprendido entre Agosto de 2013 a Junio de 2015, contribuyendo así con 2 años de investigación en la línea de biomedicina aviar del Grupo Centauro al cual pertenezco.

² Fondo de investigación de la Asociación Colombiana de Médicos Veterinarios y Zootecnistas Especialistas en Avicultura.

Para una mejor comprensión de la metodología y resultados, el manuscrito se divide por capítulos, centrados en tres preguntas acerca de dos virus inmunosupresores, revisados en el marco teórico, *Capítulo 1: ¿Qué patotipos del Virus de la Enfermedad de Marek (MDV) circulan en las granjas? ¿Se encuentra presente el Virus de la Anemia Infecciosa Aviar (CIAV) en las aves de Antioquia? ¿Cuál es la dinámica de ambos virus durante el levante?*

Para dar respuesta a estas preguntas, se tomó una muestra representativa de aves de levante del norte y oriente del departamento de Antioquia, en diferentes edades (*Capítulo 2*) para hacer seguimiento durante todo el período en que son particularmente más susceptibles a estos virus. Una vez se tomaron los órganos y tejidos a analizar, fueron procesados en el laboratorio, con técnicas normalizadas en este estudio.

Una de las técnicas usadas que requería de gran dedicación y preparación, fue la implementación de cultivos primarios para el intento de aislamiento viral, (*Capítulo 3*). Se contó con la asesoría de expertos en cultivos celulares (Doctor Diego Piedrahita y la doctora Jenny Jovana Chaparro) quienes brindaron las bases para un eficiente manejo y mantenimiento de las células viables en condiciones *in vitro*. Además se realizó un entrenamiento en elaboración de cultivos de embrión de pollo para aislamiento y titulación viral en el laboratorio de la doctora Holly Sellers (Clinical and Molecular Virology) y la doctora Maricarmen García (Infectious Laryngotracheitis Virus and Avian Influenza) del Poultry Diagnostic and Research Center de la Universidad de Georgia, USA. Una vez realizada la pasantía, y cuando se obtuvieron los materiales necesarios, se logró establecer con éxito un cultivo primario de embrión de pollo con los cuales se realizó el intento de aislamiento en el laboratorio de la Facultad, (*Capítulos 4 y 7*).

La técnica de PCR para cada serotipo del virus de la Enfermedad de Marek (MDV) fue estandarizada y corrida para el total de las muestras, (*Capítulo 4*). La PCR en tiempo real se realizó en el Instituto de Pirbright, en el Reino Unido, el cual es el laboratorio de referencia de la OIE para la Enfermedad de Marek. Allí se confirmaron los resultados que se habían obtenido en nuestro laboratorio y se realizó secuenciación de algunas muestras para verificar su patotipo. El estudio del MDV fue financiado por COLCIENCIAS (Código 111552128321. Contrato 0155 – 2012).

En el *capítulo 5* se muestran los resultados de la PCR para el CIAV, el cual se realizó gracias a la financiación de los materiales por parte de AMEVEA. Los resultados de esta parte del trabajo fueron socializados con la comunidad académica el día 8 de octubre del 2014 en el día avícola AMEVEA, Medellín, que contó con la participación de expositores de todo el país, egresados, profesores y productores del sector avícola.

Una vez se verificó la presencia de ambos virus en las muestras, se realizó un estudio histopatológico para verificar cambios y degeneración en los órganos linfoides compatibles con la infección por los virus. El doctor Diego Aranzazu de la Universidad de Antioquia, y la doctora Susan Williams de la Universidad de Georgia dieron su diagnóstico como patólogos de acuerdo a lo que observaron en las placas, haciendo énfasis en hallazgos compatibles a infección con estos virus. Los resultados se consolidaron como una publicación en la revista Plumazos (AMEVEA) versión 51, Marzo de 2015, *Capítulo 6*.

En paralelo con el estudio, se presentó un caso clínico de la enfermedad de Marek, con el que se pudo aplicar todas las técnicas estandarizadas en el trabajo de grado, logrando así analizar una cepa muy virulenta del virus, en contraste a las atenuadas de las aves sanas. Todos los datos están disponibles en el *capítulo 7*.

A continuación se encuentran entonces los 7 capítulos que dan cumplimiento a los objetivos planteados al inicio del estudio, cada uno en formato artículo científico con resultados originales.

2. Agradecimientos

El lograr finalizar este trabajo de grado se lo atribuyo al apoyo incondicional de mi familia, tutores y amigos, sin los cuales, sé que no hubiera logrado jamás superar estos años de trabajo duro.

A mis padres por su apoyo incondicional durante estos años; a mis tutores: la doctora Jenny Chaparro Gutiérrez, el doctor Diego Piedrahita y la doctora Gloria Consuelo Ramírez Nieto, por sus enseñanzas, consejos y la oportunidad que me dieron de realizar este trabajo con ellos.

Y a las entidades que colaboraron con la ejecución del proyecto: al Fondo de Apoyo a proyectos COLCIENCIAS; programa Joven investigador de COLCIENCIAS, AMEVEA, BIOARA S.A; Pirbright Institute UK, Poultry Diagnostic and Research Center; UGA. USA; Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

3. Resumen

Tanto el virus de la enfermedad de Marek (MDV) y virus de la anemia infecciosa aviar (CIAV) son patógenos inmunosupresores que causan el síndrome de mortalidad temprana y bajas en la producción cuando se da una coinfección. Aunque la industria avícola colombiana ha aumentado casi al doble en la última década, no hay información sobre algunos agentes infecciosos que circulan en el país. Es poco probable que ocurran casos clínicos de MVD debido a los programas de vacunación generalizada con MVD serotipo I y III; sin embargo, las pérdidas por infección subclínica son comunes debido a la inmunosupresión por MVD y CIAV. Este estudio utilizó PCR y RT-PCR en muestras de DNA extraídas de la sangre y de la pulpa de la pluma para detectar la presencia de *Gallid herpesvirus 2*, *Gallid herpesvirus 3*, *Meleagrid herpesvirus 1* y CIAV en 4 granjas de postura comercial. El patotipo de MDV fue determinado por PCR, seguido por la alineación de aminoácidos de la proteína *Meq* y análisis filogenético. El intento de aislamiento del virus se realizó en cultivos primarios con confirmación por PCR. Los órganos del sistema inmune se evaluaron por histopatología para verificar lesiones asociadas con ambos virus. Encontramos que los dos virus están presentes en todas las granjas evaluadas, lo que podría estar asociado a fallas en la vacunación. Los resultados de este trabajo demuestran por primera vez la identificación molecular de MVD y CIAV y la presencia de coinfección en aves de Colombia.

Palabras clave: *Enfermedad de Marek, Anemia infecciosa aviar, Antioquia, Colombia.*

4. Summary

Both Marek's disease virus (MDV) and chicken infectious anemia virus (CIAV) are immunosuppressive pathogens that during co-infection cause worsen the production efficiency and mortality in chicken flocks. Although the Colombian poultry industry has increase almost to the double in the last decade, there is not information about circulating strains or the infectious status of both of these viruses in the country. It is unlikely that clinical forms of MVD are occurring due to widespread vaccination programs with MVD serotype I and III; however, subclinical infection losses are probably common due to immunosuppression by both MVD and CIAV. This study used PCR and rtPCR detection methods in DNA samples extracted from blood and feather pulp pools to detect the presence of MDV *Gallid herpesvirus 2*, *Gallid herpesvirus 3*, *Meleagrid herpesvirus 1* and CIAV in 4 commercial layer farms. The pathotype of MDV was determined by PCR, followed by amino acid alignment of Meq protein and phylogenetic analysis. The virus isolation attempt was made in primary cultures with confirmation by PCR. The organs were evaluated by histopathology to verify lesions associated with the virus. We found both viruses in young layers in Colombia and could be altering the immune response to vaccination. The results of this work demonstrate for the first time the molecular identification of MVD and CIAV and the presence of co-infection in birds from Colombia.

Key words: *Marek Disease Virus*, *Chicken Anemia Virus*, *co-infection*, *Colombia*

5. Introducción general

Se ha calculado que durante la última década, el crecimiento en la industria avícola nacional estuvo cerca del 80,7% (1,2), lo cual es resultado directo de la intensificación de las explotaciones y aumento en el número de animales encasetados por granja. Estas condiciones pueden generar una perturbación de la competencia inmunológica de las aves, y resultar en un impacto económico negativo causando un efecto deletéreo en los parámetros productivos y el bienestar de las aves. En algunos países como Estados Unidos de América, se han reportado pérdidas de más de 2.300 millones de dólares al año como consecuencia directa de la inmunodepresión (3), la cual genera baja producción en las aves, aumento en la susceptibilidad a infecciones secundarias, mala conversión alimenticia, mortalidad y falta de respuesta adecuada a las vacunaciones (4). En Colombia se calcularon pérdidas millonarias por mortalidad para el año 2008³, como consecuencia directa de agentes inmunosupresores (5).

Las alteraciones del sistema inmune son de carácter multifactorial, e incluyen causas no infecciosas, tales como factores ambientales, nutricionales, tóxicos y condiciones de manejo (6), así como causas infecciosas que involucran virus como el causante de la Enfermedad de Marek (MDV), Anemia Infecciosa Aviar (CIAV), Retículo Endotelosis (VRE), Reovirus, virus de la Leucosis Aviar, virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio (VEIBF), además de otros agentes como las coccidias (7). Dentro de estos patógenos, se resaltan el MDV y el CIAV, ya que presentan distribución mundial, y se reporta que un alto porcentaje de las parvadas comerciales son seropositivas a dichos agentes (8–11). Estos virus generan inmunodepresión severa en aves menores de cuatro semanas de vida, resultando en un cuadro clínico complejo, el cual se

³ ICA. Sistema de Información y Vigilancia Epidemiológica. COLOMBIA, SANIDAD ANIMAL 2008. INFORME TÉCNICO Bogotá, D.C., 2009

manifiesta con una reducción marcada en el peso corporal, atrofia de la bursa, timo y médula ósea, con alta mortalidad en ausencia de linfomas o neuritis (12–14). Aunque algunos casos de coinfección con MDV y CIAV fueron reportados en Japón (15), USA (16), Holanda, Italia (17), Alemania (18), Israel (19) y Australia (13), se han llevado a cabo pocos estudios experimentales sobre coinfección por ambos virus (16,20–22).

En Colombia se desconoce la situación epidemiológica del MDV y del CIAV, aunque se presume que pueden estar presentes en las granjas, ya que cada vez es más común el reporte de fallas en la producción, tanto de líneas de postura como de engorde, asociadas a casos de inmunosupresión. Como consecuencia de esta falta de información, no hay programas de control basados en el conocimiento de los agentes circulantes, la dinámica de infección, los patotipos o cepas presentes y su relación con los cuadros clínicos y evidencias de afección en las curvas de producción. Entonces, los programas de vacunación frente a estos virus están fundamentados en criterios comerciales o anecdóticos, que evidentemente no tienen el soporte científico y experimental en el contexto regional, generando una alteración del equilibrio enzoótico, teniendo en cuenta que un desafío inmunológico ineficiente condiciona a estos agentes infecciosos a desarrollar modificaciones genéticas que les confieren características de virulencia y patogenicidad indeseables en cualquier sistema de producción pecuario.

Según la resolución ICA⁴ 3651 del 2014, se establece que la vacunación contra el MDV es de carácter obligatorio en aves de corral durante el primer día de edad en la planta de incubación. Actualmente se encuentran en el mercado más de 45 biológicos registrados⁵ ante el ICA con diferentes cepas y serotipos del MDV, los cuales son usados de forma indiscriminada y sin considerar los

⁴ Instituto Colombiano Agropecuario

⁵ Registro de biológicos veterinarios 2013. ICA. Subgerencia de protección animal.

patotipos circulantes. Lo anterior es consecuencia directa de la falta de información disponible sobre la situación y distribución del virus en el país. Se debe tener en cuenta que dado el potencial de mutación del virus y de que el patotipo del MDV suele modificarse cada 10 años (23–25), es muy probable que haya vacunas comerciales que no estén protegiendo frente a las cepas de campo y que estén contribuyendo a la evolución hacia patotipos más virulentos. En el caso del CIAV, hasta el momento no hay una directriz establecida para su prevención, y la decisión de implementar la vacunación queda a criterio del médico veterinario de cada granja, pudiendo escoger entre tres biológicos registrados, que contienen tres cepas distintas (26).

En este estudio se planteó determinar la presencia, circulación y variantes del MDV y del CIAV durante la etapa de levante de aves de postura en dos regiones del Departamento de Antioquia, con miras a establecer presencia de infección y presentación de la coinfección de las aves en condiciones de campo, lo cual permitirá estructurar estrategias de control eficaces, basados en información propia de la región.

6. Objetivos

a. Objetivo general

Estudiar la presencia del Virus de la Enfermedad de Marek (MDV) y el Virus de la Anemia Infecciosa Aviar (CIAV) en aves de levante de granjas del norte y oriente del Departamento de Antioquia.

b. Objetivos específicos

- Determinar la dinámica de positividad para los tres serotipos del MDV por PCR y rtPCR durante la etapa de levante en granjas de postura del norte y oriente de Antioquia.
- Determinar la dinámica de la positividad CIAV mediante su detección por PCR durante la etapa de levante en granjas de postura del norte y oriente de Antioquia.
- Determinar los patotipos del MDV presentes en las muestras positivas a GaHV-2.
- Realizar intento de aislamiento en cultivo celular primario a partir de órganos de aves positivas a PCR.

Capítulo 1: Marco teórico

1.1 Anemia Infecciosa Aviar (CIAV): Revisión

1.1.1 Introducción

El CIAV es uno de los agentes que genera importantes pérdidas económicas en la industria avícola como consecuencia de su efecto inmunodepresor (27). Este virus afecta aves jóvenes generando anemia aplásica, depleción de órganos linfoides, hemorragias subcutáneas y musculares y destrucción de células hemocitoblásticas en la médula ósea (28). La enfermedad es subclínica en aves mayores de 3 semanas, pero aun así se reportan pérdidas económicas importantes, las cuales son resultado directo de la inmunodepresión, bajo crecimiento, alta mortalidad por infecciones secundarias y el costo del tratamiento de estas (29–31). En condiciones de campo, este virus genera problemas más graves cuando está asociado a otros agentes como Gumboro (32), Adenovirus, Reovirus (33,34) y Virus de la Enfermedad de Marek. El CIAV es el patógeno más comúnmente encontrado en casos clínicos de MDV (35).

El virus de la Anemia Infecciosa Aviar fue reportado por primera vez en Japón (36), y es conocido por presentar un solo serotipo, pero con características patogénicas diferentes entre los aislamientos (37,38). Las gallinas (*Gallus gallus domesticus*) son el único hospedero natural reconocido, aunque varios estudios revelan la prevalencia del virus en aves domésticas y silvestres (39). El CIAV es el miembro de la familia *Circoviridae* más estudiado; una de las razones de esto fue a su aislamiento en líneas de células transformadas por MDV: MDCC – MSB1, permitiendo así la caracterización del agente, y el desarrollo de pruebas para detectar anticuerpos neutralizantes en el suero de las aves (40–43).

La enfermedad clínica se conoce como síndrome de dermatitis y anemia, enfermedad del ala azul, anemia infecciosa o síndrome hemorrágico (44). La mortalidad ha sido reportada de hasta 60% pero lo más común es que ocurra solo entre 5 y 15%, mientras que la morbilidad se reportó del 20 al 60% (44). La serología demuestra que hay alta prevalencia del virus a nivel mundial con diferencias antigénicas encontradas en las pruebas de neutralización viral con anticuerpos monoclonales (44), sin embargo, los aislamientos han demostrado poca variabilidad a nivel del genoma.

Cuando se da una infección con CIAV en aves menores de 2 semanas de edad y en ausencia de anticuerpos maternos, se genera daño severo en órganos linfoides primarios y secundarios, provocando así atrofia linfoide generalizada, anemia aplásica, lisis de linfocitos T inmaduros y baja producción de anticuerpos (7,23). La forma clínica actualmente es rara debido a la vacunación de reproductoras, sin embargo la forma subclínica es común ya que los anticuerpos previenen la presentación de los signos pero no la infección, transmisión o infecciones secundarias que resultan como consecuencia de la inmunosupresión (45). En Colombia no es obligatorio el uso de vacuna contra CIAV, (Resolución 811 de 1992 del ICA⁶, derogada por la R.3651 de 2014), pero se encuentran vacunas disponibles en el mercado, tales como: NOBILIS AE7+POX8+CIAV9, Circomune® (*Cepa del Ros*) y Avipro Thymovac® (*Cepa Cux-1*), las cuales están indicadas para uso en reproductoras. Sin embargo, la decisión de vacunar o no, queda en manos de cada productor, siendo la mayoría de veces omitida en el plan vacunal, o más grave aún, utilizando cepas indiscriminadamente.

⁶ Instituto Colombiano Agropecuario (ICA)

⁷ Encefalomiелitis aviar cepa *Calnek*

⁸ Virus de la viruela (*Gibbs*)

⁹ Virus vivo de anemia infecciosa aviar cepa 26P4

1.1.2 Características del virus.

El CIAV es pequeño (25 nm), pertenece al género *Gyrovirus* miembro de la familia *Circoviridae*. Los virus de este género se caracterizan por ser desnudos, de simetría icosaédrica, con un genoma de tipo DNA circular de cadena simple de sentido negativo (*Ilustración 1*) (46,47) (48,49). Hasta el momento no se han encontrado más serotipos entre las cepas aisladas alrededor del mundo (38).

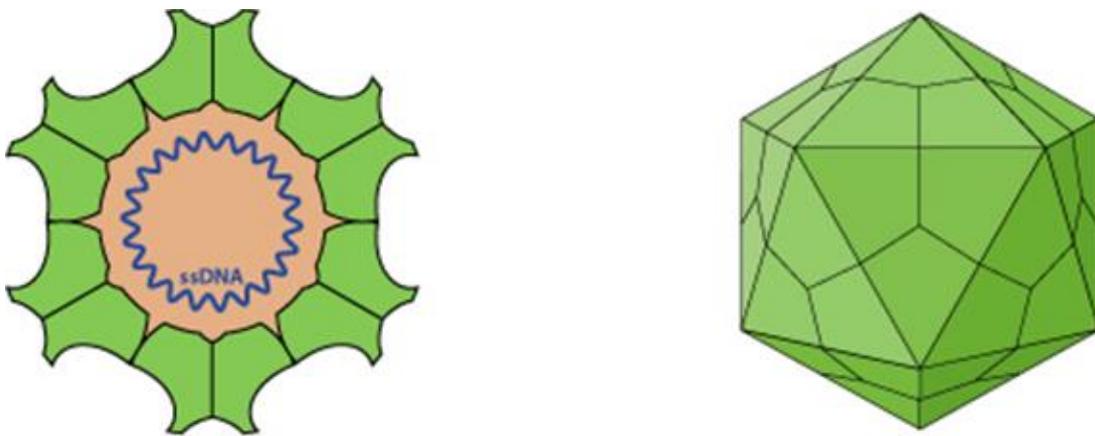


Ilustración 1: Estructura del virión del género *Gyrovirus*. Se observa la morfología del CIAV, mostrando la cápside icosaédrica que envuelve el DNA circular de cadena simple. Fuente: Swiss Institute of Bioinformatics, 2012.

El virus es muy estable bajo condiciones ambientales normales, resiste temperaturas altas y pH extremos. No se inactiva con éter ni cloroformo, pero es susceptible a los tratamientos con yodo o hipoclorito (43). La carencia de envoltura ayuda a explicar la notable habilidad del virus para sobrevivir a condiciones extremas, tanto físicas como químicas. Además, contribuye a que su distribución sea ubicua (30).

El CIAV tiene un genoma de tamaño aproximado de 2,3 kb (47,50). Presenta tres marcos abiertos de lectura (o por sus siglas en inglés ORF): VP1, VP2 y VP3, los cuales se encuentran parcialmente solapados (51–53). Estos ORF

transcriben un solo mRNA policistrónico (51,54,55), el cual codifica para las 3 proteínas virales requeridas para la infección de células en división. Estas células susceptibles son: hemocitoblastos de la médula ósea, precursores de linfocitos T en el timo o células T estimuladas por un antígeno (7).

El gen ORF-1 (Marco abierto de lectura, ORF por sus siglas en inglés Open Reading Frame), codifica para una proteína de 52 kDa (VP1), la cual es responsable del ensamblaje de la cápside viral (56). El gen ORF-2 codifica una proteína no estructural de 28 kDa (VP2) la cual tiene actividad fosfatasa (53,57). El gen ORF-3 codifica una proteína de 13 kDa (VP3) que genera apoptosis en líneas de células tumorales aviares y humanas (52,54).

La proteína viral 1 (VP1) se encuentra cargada positivamente en la región N-terminal la cual incluye entre 50 y 60 aminoácidos; esta región actúa como sitio de plegamiento del DNA lo que permite que sea incorporado en la cápside (47). La cápside está compuesta por 32 subunidades, arregladas de forma icosaédrica clásica (58). Se ha reportado una región hipervariable en VP1 que codifica 13 aminoácidos (desde el 139 al 151). Los aminoácidos ubicados entre 139 y 144 desempeñan un papel clave en el crecimiento y propagación del virus (59). Además se sabe que el aminoácido en la posición 394 puede ser el mayor determinante genético de la virulencia (60); si se encuentra glutamina en esta posición, el aislado es altamente patogénico; pero si se encuentra histidina es menos patogénico (38).

La VP2 interactúa con VP1 promoviendo la conformación proteica correcta de la cápside, lo que permite la evasión de los anticuerpos neutralizantes (50); es por esto que las dos proteínas son buenos candidatos como inmunógenos para el desarrollo de vacunas o pruebas diagnósticas.

La transcripción del gen ORF-3 produce apoptina (VP3), la cual es una pequeña proteína de 121 aminoácidos que contiene dos regiones ricas en prolina, una región hidrofóbica y dos regiones cargadas positivamente (61); Funcionalmente induce apoptosis en células tumorales humanas (por una vía independiente de p53, e insensible a las Bcl-2 y CrmA, inhibidores de apoptosis), pero no en células sanas, lo que puede sugerir que tenga uso terapéutico para el cáncer por su efecto inductor de la apoptosis selectiva (52,61).

La VP3 es la principal causante de la inmunodepresión por su efecto apoptótico en los hemocitoblastos, generando una disminución en el número de eritrocitos, trombocitos y granulocitos; la pérdida de éstos dos últimos tipos celulares son los responsables del cuadro clínico asociado con la infección con CIAV (la enfermedad del ala azul) (7). La VP2 también puede jugar un papel en la inmunosupresión a través de la regulación del Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo I (CMH-I) (7).

1.1.3 Transmisión del CIAV

El CIAV se transmite tanto de forma horizontal como vertical y además, puede estar presente de forma latente en aves (62). La transmisión vertical ocurre en presencia o ausencia de anticuerpos, y puede incluir la transferencia de virus latente, o quizás sólo de DNA viral (63). Esta vía da como resultado enfermedad clínica severa caracterizada por atrofia linfoide generalizada, aumento de la mortalidad (alrededor del 10%) y desarrollo de hemorragia subcutánea e intramuscular (42,64). Por otro lado, la infección horizontal se da por contacto directo o indirecto, ingresando por vía oral y respiratoria (65,66) y siendo eliminado por materia fecal y por el epitelio de la pluma (67). Otra forma de transmisión es a través de vacunas contaminadas con el CIAV; esta última parece ser la causa de su distribución a nivel mundial (66).

Inicialmente se pensó que la vía de transmisión vertical era la forma más importante de infección, pero la transmisión horizontal es crucial para el establecimiento de la infección en parvadas comerciales. La infección horizontal se atribuye a la ruta oral- fecal, además de la mucosa traqueal (68). Los programas de prevención hoy en día se deben basar en minimizar la diseminación horizontal, ya que en cualquier edad se da la infección (63).

En las reproductoras infectadas, la transmisión del virus comienza de los 7 a los 14 días post-infección y su eliminación puede durar de 3 a 9 semanas dependiendo de los niveles de anticuerpos neutralizantes (43,69). Las aves adquieren resistencia a la enfermedad a medida que avanza la edad, pero siguen siendo susceptibles a la infección. La disminución de sensibilidad al cuadro clínico se da después de las 2 semanas de edad (22). Algunos autores sugieren que esta resistencia adquirida con la edad se debe a que sólo los precursores de linfocitos T de la segunda oleada en el desarrollo son susceptibles a la infección (22), pero se ha encontrado que los linfocitos y macrófagos del bazo, timo y médula ósea permanecen susceptibles a la infección después de los 28 días (70); además, esto no explica por qué la línea eritroide no es susceptible en aves de más edad (71).

Generalmente la enfermedad clínica es rara, debido a la vacunación de reproductoras, pero la forma subclínica es común (72). Los anticuerpos maternos van descendiendo en la progenie hasta la tercera semana de vida y tienden a desaparecer, si estas aves no son nuevamente infectadas o vacunadas a nivel de granja (45).

1.1.4 Patogénesis

El CIAV causa efecto citopático fatal en timocitos y células mononucleares debido a la apoptosis (61). La depleción de la corteza tímica es la responsable

de la inmunodeficiencia transitoria que facilita las infecciones secundarias y fallas en la vacunación. Aves coinfectadas con MDV, Gumboro, Virus de la Reticuloendotelosis, Adenovirus o Reovirus normalmente desarrollan signos clínicos más severos (73).

Las características morfológicas y bioquímicas indican que los timocitos infectados con CIAV se destruyen por medio de la apoptosis (73). El DNA aislado del timo de aves infectadas con CIAV muestra un patrón específico de apoptosis en gel de electroforesis¹⁰. Además, por microscopia electrónica se ha encontrado que toda la corteza del timo presentaba cromatina condensada 10 días después de la infección.

Existen varias formas replicativas en células infectadas por el CIAV: doble cadena circular abierta, DNA lineal, DNA superenrollado y una sola cadena circular. Con ésto se sugiere que la vía de replicación del CIAV es por el mecanismo del círculo rodante, el cual fue descrito por primera vez para el virus fX-174 (Bacteriófagos DNA de cadena simple) (52,74).

Después de la infección en aves de 1 día de edad, el CIAV se detecta en los hemocitoblastos (células precursoras de eritrocitos y mielocitos) (42), 3 o 4 días después de la infección (75). A los 8 días pos infección (pi) se da la depleción de células hemocitoblásticas, que resulta en anemia y trombocitopenia, generando por consiguiente hemorragias (43). En los espacios extrasinusoidales, los hemocitoblastos son precursores de la línea de granulocitos, por lo tanto también se evidencia una disminución en el número de granulocitos en la sangre (76). Todo esto se ve reflejado en el hemograma (42). Sin embargo, después de 16 días post infección los niveles de estas células pueden encontrarse nuevamente en niveles normales en la médula ósea (43).

¹⁰ DNA Laddering patter

En los órganos linfoides, los precursores de linfocitos T en la corteza del timo son el principal blanco del virus (77) y son los primeros en ser destruidos, mientras que las células no linfoides no son afectadas. En concordancia con lo anterior, el antígeno viral ha sido demostrado en grandes cantidades a nivel de la corteza del timo, pero poco en la médula ósea (78). A pesar de que se ha demostrado que la patogenia del CIAV está fuertemente relacionada con la inmunidad humoral y que la presencia de anticuerpos maternos inhibe completamente la infección, se ha recuperado CIAV de órganos de aves inoculadas por un período extendido de infección, incluso después de que los anticuerpos neutralizantes fueran encontrados (79).

Algunos estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado una disminución en el número de células CD8+ a nivel del timo (22). En el bazo, la mayor población de células infectadas con el CIAV son las CD3+CD8+TCR $\alpha\beta$, mientras que las células Natural Killer (NK) al parecer son resistentes a la infección (7). Los linfocitos T del bazo parecen ser infectados a partir de células que fueron previamente infectadas como precursores del timo, y que después migraron al órgano, aunque también se pueden infectar los linfocitos maduros en el bazo (42,78).

Aves inoculadas con CIAV al día de edad, muestran una disminución en la respuesta a la concavalina A en los linfocitos derivados del bazo, particularmente entre los 8 y 15 días de infección (20,80). Además, se acompaña de una caída en los niveles del IL-2 en las células del bazo. Esto sugiere un daño severo en la capacidad de los linfocitos T para responder a un estímulo y disminución en su capacidad mitótica. La IL-1 también se ve afectada y hay cambio severo en los macrófagos, como mala expresión de receptores FC y fagocitosis, y falla en su actividad microbicida (70).

El mecanismo por el cual los macrófagos son afectados, es diferente al de los linfocitos, ya que los primeros no permiten la proliferación viral. Es posible que la reducción en la función de los macrófagos se presente por una unión del virus al macrófago y está mediado por factores secundarios, aunque no está claro el proceso (42). Se ha encontrado que aves de 3 semanas de edad expuestas al virus desarrollan una inmunosupresión marcada de células T y una disminución en la función de los macrófagos, a pesar de no presentar signos clínicos. Esta falla en el sistema inmune hace más efectiva la infección con agentes secundarios (42).

Al parecer las células B no son susceptibles a la infección. Los efectos directos que aparecen en la Bursa de Fabricio pueden estar mediados por la acción de las citoquinas, pero no directamente por la acción del virus. Sin embargo, es posible que las células B se vean afectadas debido a la disfunción de las células T ayudadoras, y las citoquinas que estas producen, como la IL-4, IL-6 e IL-8, y esto afecta dramáticamente la respuesta de anticuerpos (42). La baja susceptibilidad de los linfocitos B al CIAV es crucial para la recuperación de las aves. La aparición de anticuerpos contra CIAV en el suero coincide con la desaparición del virus de la sangre, órganos y la mayoría de tejidos aunque el virus puede persistir en algunas células sugiriendo que tal vez hay otros factores que influyen en la eliminación viral (76).

A pesar de que la vacunación induce altos títulos de anticuerpos, la enfermedad clínica se ha observado en aves de 2 a 4 semanas tanto a partir de madres vacunadas como de no vacunadas, sugiriendo que hay persistencia del virus en las reproductoras, y puede haber transmisión vertical intermitente y por consiguiente algunos brotes de enfermedad clínica en la progenie (81).

El desarrollo de anticuerpos en las reproductoras es considerado una forma importante de prevención de la transmisión vertical. Otaki reportó que aves que

venían de madres con anticuerpos neutralizantes por encima de 1:40 sobrevivían al reto con el virus y no presentaban enfermedad (82), aunque también se ha sugerido que para prevenir la eliminación por la materia fecal y por tanto la transmisión vertical se necesitan títulos de 1:256 (83). Además, se demostró que el genoma del CIAV podía persistir en órganos reproductivos y ser pasados a su descendencia, aun en presencia de anticuerpos (62).

1.1.5 Signos clínicos

La infección de aves con CIAV se manifiesta con un cuadro clínico complejo, y signos patológicos, los cuales pueden ser evidentes o no (63). La enfermedad en campo se observa cuando hay transmisión vertical, en la progenie de reproductoras libres de anticuerpos para CIAV (84). Se ha reportado que el CIAV puede generar infección en aves menores a 3 semanas y produce pérdidas económicas importantes (43). Las aves de mayor edad son susceptibles a la infección pero no a la enfermedad (85); esta infección viene acompañada de efecto inmunosupresor, lo que genera baja respuesta a la vacunación y aumento en la susceptibilidad a infecciones secundarias.

Los primeros síntomas se presentan a partir de los 10-14 días de vida, con un pico de mortalidad entre los 14 y 21 días de edad y debido a la transmisión horizontal, se presenta un segundo pico entre los 30 y 33 días de vida (86). Las aves infectadas presentan anemia (hematocrito entre 20 y 27%)¹¹ desde el nacimiento hasta la semana y media de edad (44, 87), pero se recuperan completamente a las 5 o 6 semanas de vida (88). La médula ósea de huesos largos se puede encontrar amarillenta o rosa claro. También se evidencia hepatomegalia y hemorragias en la mucosa proventricular (89), muscular y subcutánea (69). En este último caso puede aparecer hemorragia en el ala y

¹¹ Según Bounous y Steadman 2000, el hematocrito va de 35 a 55%. Valores inferiores a 35% indican anemia, y superiores a 55% indican policitemia o deshidratación

complicarse con infecciones bacterianas secundarias y una dermatitis gangrenosa (Ala azul con *Staphylococcus aureus*) (34); se puede encontrar también atrofia de los órganos linfoides secundarios (69,86). A nivel histológico se observa depleción severa de la línea hemocitoblástica en la médula ósea y depleción cortical severa en el timo (61). Cuando la enfermedad no es fatal, ocurre repoblación celular a las 3 o 4 semanas después de la infección (58).

Los síntomas pueden tener diversos grados de severidad de acuerdo a la diferencia de susceptibilidad asociada a la edad y diferencias en la maduración del sistema inmune; la mortalidad no suele superar el 30%. Los polluelos que sobreviven tienden a recuperarse de la depresión y anemia a los 20 a 28 días pos-infección (86). En infecciones experimentales en aves SPF¹², las lesiones más consistentes de la enfermedad fueron el bajo valor del hematocrito, por debajo del 27%, la médula pálida y la atrofia del timo. Otros síntomas como hemorragias y atrofia de la bursa de Fabricio no se presentaron consistentemente y las lesiones de piel no se presentaron nunca, indicando que dependen de otros agentes patógenos presentes en los brotes de campo (90).

Se ha encontrado un vínculo entre las infecciones por CIAV y un deterioro general del estado de salud de los pollos adultos. En 1997, se reportó una correlación estadísticamente significativa entre la presencia de anticuerpos al momento de sacrificio y las tasas de decomiso en planta de beneficio (86). Además, la infección con CIAV incrementa la incidencia de condronecrosis y osteomielitis en aves infectadas con *Staphylococcus aureus*; facilita infecciones secundarias con *Escherichia coli*, *Aspergillus sp.*, y *Clostridium sp.*; además aumenta patogenicidad de otros virus como adenovirus, retrovirus, virus de New Castle, MDV y Gumboro (91).

¹² Specific pathogen free= libres de patógenos específicos.

1.1.6 Diagnóstico

El diagnóstico de CIAV se basa en los signos clínicos, hallazgos macro y microscópicos de la necropsia (92), pruebas serológicas como la de neutralización viral (33), ELISA (40) e inmunofluorescencia (93) y pruebas de detección directa como la PCR, DotBlot (51), hibridación *in Situ* y aislamiento en cultivos celulares (46). La detección del CIAV por métodos no moleculares incluye el aislamiento en cultivo celular, huevos de embrión de pollo e inoculación en aves susceptibles.

El aislamiento en cultivo celular requiere de líneas celulares específicas, y una prueba de confirmación por inmunofluorescencia (76). El CIAV no es capaz de replicarse *in vitro* en células de fibroblasto, ni de riñón de embrión de pollo (76). Normalmente, el virus no crece en cultivos celulares primarios, ni líneas celulares comunes. Sólo las células linfoblastoides transformadas permiten la replicación aunque en baja cantidad (38). La línea MDCC MSB1 son las más usadas a nivel mundial para el crecimiento y aislamiento del CIAV. Aunque se ha descrito que el virus puede fallar en su replicación en estas líneas (59). El aislamiento en huevos embrionados o aves susceptibles, requiere de inoculación en el saco vitelino e identificación de lesiones macroscópicas y en ocasiones los resultados no son consistentes (58,65). Para su inoculación en cultivo celular se usa de $2-3 \times 10^5$ partículas de virus/mL; el efecto citopático se observa después de 1 a 6 sub cultivos (7-14 días en total). No hay característica citopatológica típica, pero se pueden ver células con aumento de tamaño, cariomegalia, abundante citoplasma y cuerpos de inclusión eosinofílicos (94). En estudios con patrones de tinción de anticuerpos monoclonales se han encontrado diferencias menores en patogenicidad y en su habilidad variable para infectar ciertos tipos de líneas celulares que puede estar indicando variación genotípica entre los aislamientos (81).

El virus puede encontrarse en la mayoría de órganos, debido a que la replicación de éste se da en las células madre progenitoras de los linajes de eritrocitos, trombocitos y granulocitos, los cuales se distribuyen en todo el organismo (43); sin embargo para su detección en el laboratorio se recomienda que las muestras remitidas sean timo, bazo, médula ósea e hígado; este último contiene altas concentraciones de virus (87).

Para la evaluación de la presencia de anticuerpos se han descrito métodos como el de ELISA y la Sero Neutralización Viral (SNV) (40). Los anticuerpos contra CIAV están presentes en aves vacunadas o que han sufrido la infección (47). Teniendo en cuenta que el desarrollo de anticuerpos neutralizantes es esencial para evitar la replicación viral (7), en varios estudios se ha establecido el título mínimo para protección contra la infección. Una relación de ELISA/SNV de 0-0.2, indica correlación con títulos de SNV igual o mayor a dilución 1:1024, lo que corresponde a títulos altos. Una relación de 0,2 a 0,8 indica títulos en dilución 1:256 a 1:1024, o sea bajos títulos de anticuerpos neutralizantes y por tanto protección baja. Con una relación mayor a 0,8 se consideran negativos, y hay una correlación con SNV más baja que 1:128 indicando nula capacidad de protección.

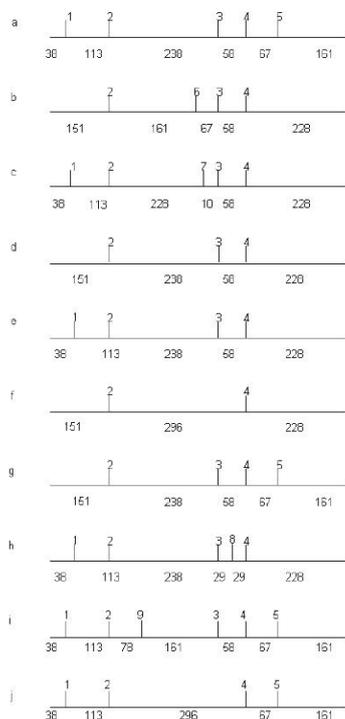
La detección por técnicas moleculares, incluyendo PCR, provee una alternativa a los métodos convencionales, ya que posee alta sensibilidad y especificidad, actualmente es una técnica sensible y específica bien instaurada en los laboratorios (95), permitiendo obtener resultados en un menor tiempo que un intento de aislamiento. La PCR para la detección de CAV es una prueba eficaz ya que detecta el DNA viral en todos los tejidos de pollo, incluidos los cañones de las plumas, siendo éstos una fuente excelente para la detección de CAV. El virus puede ser detectado en plumas tiempo después de haber pasado la fase aguda, lo cual podría ser un indicador de infección latente (63).

El CIAV en forma libre en las puntas de las plumas, o en homogenizado de tejidos como hígado y órganos linfoides de aves infectadas se puede detectar por PCR. Se ha demostrado que las plumas son efectivas para la detección del CIAV ya que tiene ventajas en cuanto a facilidad de muestreo, comparado con el análisis de órganos internos, y posee igual sensibilidad y especificidad (63), con valores de 89% y 83% respectivamente. Las plumas también se usan para diagnosticar infecciones con virus como MDV, REV¹³, IBDV¹⁴ (96,97). También pueden usarse tejidos fijados con formol (92). Los iniciadores usados para la PCR tienen como blanco la región solapada que codifica VP2- VP3 y VP1-VP2, y fueron descritos la primera vez por Taylor (98). Después de la secuencia completa del genoma del CIAV, varios autores han desarrollado sus propios iniciadores con buenos resultados en la sensibilidad y especificidad de la prueba (38,99,100). Además, el corte con enzimas de restricción de un segmento de DNA amplificado por PCR permite la diferenciación y clasificación viral al mostrar el polimorfismo en los tamaños de los fragmentos de restricción (Ver Ilustración 2) (99).

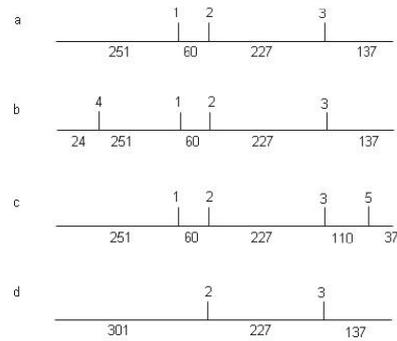
¹³ REV: Reticuloendothelosis Virus (Virus de la Reticuloendotelosis)

¹⁴ IBDV: Infectious Bursal Disease Virus (Virus de la enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio)

HaeIII digestion



HinfI digestion



HpaIII digestion

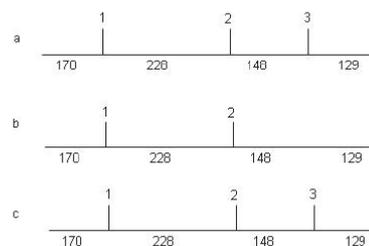


Ilustración 2: Sitios de corte y fragmentos generados por enzimas de restricción en VP1. Lado izquierdo: Sitios de corte y fragmentos generados por la enzima *HaeIII* sobre un fragmento de 675 pb que contiene el gen VP1 del CIAV. Cada patrón de restricción es identificado con una letra (a-j), el número superior indica el sitio de corte, y el número inferior, el tamaño del fragmento generado. Lado derecho: Sitios de corte y fragmentos generados por las enzimas *HinfI* y *HpaIII* sobre un fragmento de 675 pb del gen VP1 (99).

1.1.7 Epidemiología.

El CIAV se encuentra diseminado en todo el mundo, principalmente en los países de producción avícola intensiva (66,101). El virus ha sido aislado en Japón, Estados Unidos, Brasil, Alemania, Dinamarca, Inglaterra, México, Argentina, Chile, entre otros (36,65,102,103), En países como Colombia, Perú, Ecuador, Australia, Nueva Zelanda, Malasia, se ha reconocido la seroconversión como evidencia de la presencia del virus (91). Recientemente, un estudio demostró por medio de PCR la presencia del genoma de CIAV en

vacunas comerciales y la confirmó por secuenciación, lo que demuestra que una de las posibles fuentes de infección para las parvadas han sido las vacunas contaminadas (104).

En Latinoamérica hay varios estudios en los que revelan la presencia del CIAV en las aves. En México los primeros registros de la enfermedad fueron en 1993 en reproductoras y pollos de engorde, pero se reconoció como enzoótica en 1999, ya que todas las granjas estudiadas resultaban seropositivas (99). En Venezuela, a partir del año 1996, se ha reportado seropositividad al CIAV, valores bajos de hematocrito en pollos de engorde y presencia de lesiones microscópicas compatibles con las causadas por el virus (105). En el año 2001 se realizó el primer aislamiento del CIAV a partir de pollos de engorde provenientes de una granja comercial de la región central de Venezuela, que mostraron signos compatibles con CIAV (106). En el 2009 se realizó un estudio en un grupo de 320 pollos de engorde de edades comprendidas entre 1 y 4 semanas, que presentaron signos clínicos no específicos; demostrándose por PCR la presencia del DNA del CIAV en 19 de 40 granjas evaluadas (107). Otro estudio por PCR evidenció presencia del ADN del CIAV en 9 de 10 granjas evaluadas en pollos de engorde en Venezuela (87).

En el estado de Zulia, Venezuela, se realizó análisis histopatológico de órganos linfoides en 149 pollos de engorde, de los cuales el 68,5% fueron positivos a anemia por medio de ELISA (105). Del mismo modo se detectaron anticuerpos en el 90,8% de las muestras de pollo de engorde en aves de 7 y 42 días, y en el 97% en aves de 28 a 42 días (87).

Los estudios en Colombia son pocos y se basan en la detección de anticuerpos (Ac) mediante la prueba de ELISA y estudios de casos con descripción de las lesiones; uno de estos estudios fue realizado en pollos de engorde de 21 días, los cuales no presentaban anticuerpos contra CIAV, pero a los 42 días sero

convertían, lo que indica una exposición al virus de campo (108). Los autores concluyen que en aves de engorde la infección depende en gran medida de si se tienen anticuerpos maternos al primer día, ya que se observa que los que no presentan Ac tienen un bajo desempeño en los parámetros zootécnicos (109).

1.1.8 Co-infección

Las infecciones más reportadas junto con CIAV son dermatitis gangrenosa (*Staphylococcus aureus*), colibacilosis y aspergilosis pulmonar (110). Además se asocia con un aumento en la susceptibilidad a condronecrosis bacteriana con osteomielitis (*Staphylococcus aureus*) (111). El CIAV también promueve la multiplicación del *Cryptosporidium* (112), y genera sinergia con virus como New Castle (NDV), MDV (Virus de la Enfermedad de Marek) y VEIBF (Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio). Después de una infección dual con anemia y otro agente, se ha demostrado el sinergismo y potenciación que tiene el otro agente, generando lesiones más severas cuando se encuentra con CIAV que cuando está solo (42).

La respuesta inmune a muchas de las vacunas, incluidas MDV, NDV y laringotraqueitis, ha demostrado ser interferida cuando éstas se aplican en aves infectadas con CIAV. (42). Igualmente se ha observado que si se vacunan aves infectadas con CIAV contra NDV o MDV se puede generar reacciones severas a pesar de usar cepas muy atenuadas (42).

En aves infectadas con CIAV, a los 14 días pos-infección, se encuentran abundantes cambios histológicos, como necrosis focal e irregular del folículo de la pluma, células epiteliales hinchadas, necrosis, núcleos picnóticos y cuerpos de inclusión, además de vacuolas alrededor de los núcleos picnóticos (63). El cálamo de la pluma de las aves posee elementos de tejido y sangre de los pollos. La cavidad del folículo posee plasma y células sanguíneas, además de

queratinocidos, lo cual es un medio ideal para mantenimiento del virus. Se cree que el CIAV está presente en el folículo de la pluma, tanto de forma libre de células como asociado a ellas (63). En el caso del MDV, el epitelio del folículo de la pluma ha sido demostrado como el único sitio anatómico donde se produce virus infectante de forma estable como partícula libre de células, el cual se disemina a través del polvo; las aves inhalan el polvo y adquieren el MDV a través de la membrana mucosa (63).

La relativa estabilidad y distribución del CIAV es similar a la de otros agentes, como MDV (113). Dado que tanto el MDV como el CIAV presentan distribución mundial, la mayoría de parvadas comerciales porta ambos virus en cantidades variables. Desafortunadamente pocos estudios experimentales han sido llevados a cabo sobre coinfección de ambos virus. Otaki *et al*, demostraron que la eficacia de vacunación contra MDV declinaba cuando había presencia de CIAV (21,114). Jeurissen y Boer demostraron mortalidad elevada cuando se presentaba la coinfección, pero que dependía de la dosis inoculada, ya que ambos virus atacan células T (77). Se sugiere que a nivel celular se dan interacciones entre los dos virus, y son estas las que producen el aumento de patogenicidad. Cuando se da una dosis muy elevada de MDV, el CIAV induce apoptosis de las células T activadas, e inhibe la patogenicidad ocasionada por el virus de la enfermedad de Marek (62). También se ha demostrado que dependiendo de la cepa de MDV la modulación por parte del CIAV puede controlar los signos y aparición de tumores (115).

1.2 Virus de la Enfermedad de Marek

1.2.1 Introducción

La enfermedad de Marek (EM) es una afección de carácter linfoproliferativo de las aves de corral causada por el agente *Gallid Herpesvirus 2 (GaHV-2)*, conocido también como MDV¹⁵ o serotipo 1 (23,24,116,117). El GaHV-2 es un agente altamente contagioso (118); la forma crónica clásica se observa por lo general en aves de 3 a 5 meses de edad y se caracteriza por generar lesiones nerviosas que causan parálisis espástica. Una forma sobreaguda del cuadro clínico, se desarrolla en aves más jóvenes (de 8 semanas de edad), con tumores en los intestinos, hígado y gónadas (119,120). Se ha encontrado que el MDV también puede inducir otros síndromes clínicos como la parálisis transitoria, mortalidad temprana, infección citolítica, arterioesclerosis y enfermedad neurológica persistente (23). El primer caso publicado de la EM fue en 1907 por el doctor Józef Marek, en Hungría, de ahí el nombre de la enfermedad. En solo 7 años (1914) se reportó la enfermedad en USA y después de eso en casi todos los países del mundo (23,121).

Este *Herpesvirus* posee propiedades linfotrópicas similares a las de los *gamma-Herpesvirus*, pero por su estructura molecular y organización genómica se clasifica como *alpha-Herpesvirus*; además, el virus establece latencia en linfocitos, tiene un oncogén en su genoma y es capaz de inducir linfomas (23,25,122). Hasta hace pocos años, la EM era controlada eficientemente gracias a la vacunación (113,123). Para esto se utilizaban biológicos pertenecientes a 3 categorías: *GaHV-2* (con cepas atenuadas), *GaHV-3* (naturalmente apatogénicas), y *Herpes Virus* del Pavo (*MeHV-1*) (124); sin

¹⁵ Marek disease virus 1= MDV 1

embargo, hoy en día crece la preocupación ya que se ha demostrado que los tres serotipos desarrollan rápidamente características moleculares y biológicas alteradas después de pasajes seriados *in vitro*, indicando que pueden existir mutaciones espontáneas a nivel de campo, y por lo tanto modificación en su capacidad de virulencia (124). Se ha concluido que es poco probable que el serotipo 3 presente mutación espontánea, mientras que el serotipo 1 ha demostrado que desarrolla características biológicas alteradas luego de pocos pasajes en cultivos celulares, como lo son la pérdida de oncogenicidad, disminución de la expresión de la proteína C y una pérdida de replicación *in vitro* (23), por esta razón, aun después de que se aplica vacuna *GaHV-2* o *MeHV-1*, pueden producirse infecciones con cepas muy virulentas de *GaHV-2* (25,123,125).

Por otro lado, la importancia económica de esta enfermedad ha sido estudiada en detalle por algunos autores (123,124), los cuales concluyen que las pérdidas económicas se deben a la inmunosupresión (como ya se explicó anteriormente) y decomisos en la planta de beneficio.

1.2.2 Características del MDV

El MDV es un virus DNA que pertenece a la familia *Herpesviridae*, sub familia *Alphaherpesvirinae* y el género *Mardivirus* (126,127). A esta familia pertenecen los virus envueltos y de estructura esférica de 120-200 nm de diámetro, con un genoma DNA linear de doble cadena, de aproximadamente 175 Kpb. (128–131). Posee una cápside formada de 162 capsómeros y es rodeado por un tegumento amorfo, el cual contiene glicoproteínas complejas (ilustración 3) (132).

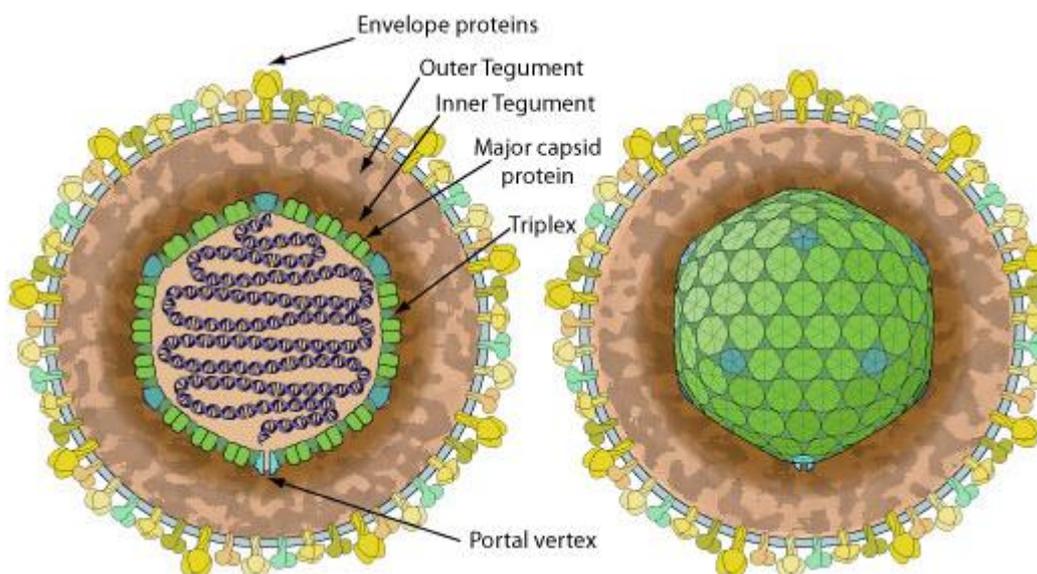


Ilustración 3: *Herpesviridae*. Estructura del virión.

Fuente: Swiss Institute of Bioinformatics, 2012. En la imagen se representa la morfología del virus, y la ubicación de las diferentes proteínas de su cápside (interna) y envoltura (externa).

El virus se adhiere a los receptores y moléculas extracelulares (uno de ellos el Heparán sulfato) probablemente mediante la proteína gB, mientras que la infección de células vecinas se da por contacto directo a través de puentes intracelulares. Para que se de esta difusión, el virus necesita un contacto entre las células, es por esto que la infección con MDV se puede dar en linfocitos (durante la presentación antigénica), y células epiteliales (23).

Se han encontrado 10 glicoproteínas en las cepas vv+ gB, gC, gD, gE, gH, gI, gK, gL, gM y gN, (133–135). Adicional a estas, se codifica una glicoproteína de membrana (gp82) (136). De los genes que codifican para estas proteínas, se ha reconocido que el B, E, M y N son esenciales para la replicación (137,138).

Los tres serotipos pueden ser diferenciados usando una prueba con anticuerpos mono o policlonales, por patrones de polipéptidos y por análisis de DNA (139). Se puede encontrar más de un serotipo en la misma ave, como ya se ha demostrado en estudios previos (140). La virulencia u oncogenicidad se

relaciona solamente con el *GaHV-2* (118,141). Dentro de este grupo se reconoce una gran variación en el potencial patógeno y representa un reto continuo, desde aquellos casi avirulentos hasta los que tienen máxima virulencia (129). Debido a esta variabilidad, las cepas del *GaHV-2* se han clasificado en 4 patotipos: leve (m), virulento (v), muy virulento (vv) y muy virulento plus (vv+) (131,142). Un punto crítico del *GaHV-2* es su patrón de evolución en la virulencia de las cepas. Por varios años, la EM fue una enfermedad clásica inducida por los virus del patotipo *mGaHV-2*. A finales de 1940, se observó primero una forma más virulenta del *GaHV-2*, relacionada con los virus del patotipo *vGaHV-2*, que se convirtió en el patotipo dominante durante 1960 (142). Las cepas virales del patotipo *vvGaHV-2*, se observaron primero a finales del decenio de 1970, principalmente en parvadas vacunadas contra *MeHV-1* con pérdidas excesivas por EM, y actualmente parece ser el tipo dominante (Ilustración 4) (23). Estos datos sugieren que el *GaHV-2* se ha vuelto más virulento en la última década, y es de esperarse de que continúe a ese ritmo si no se establecen medidas de control eficientes (24). La evolución gradual de los patotipos hacia una mayor virulencia y los cambios en las propiedades biológicas de MDV durante un retropasaje in vivo, apoyan además la teoría de mutabilidad de los *GaHV-2* (24).

Es importante tener en cuenta que hay lesiones específicas asociadas a los patotipos que permiten diferenciarlos en condiciones de campo, por ejemplo el *vvGaHV-2* genera alta incidencia en lesiones viscerales, mientras que el *vv+GaHV-2* se caracteriza por sus lesiones neurológicas y su rápida transmisión (24,143–146).

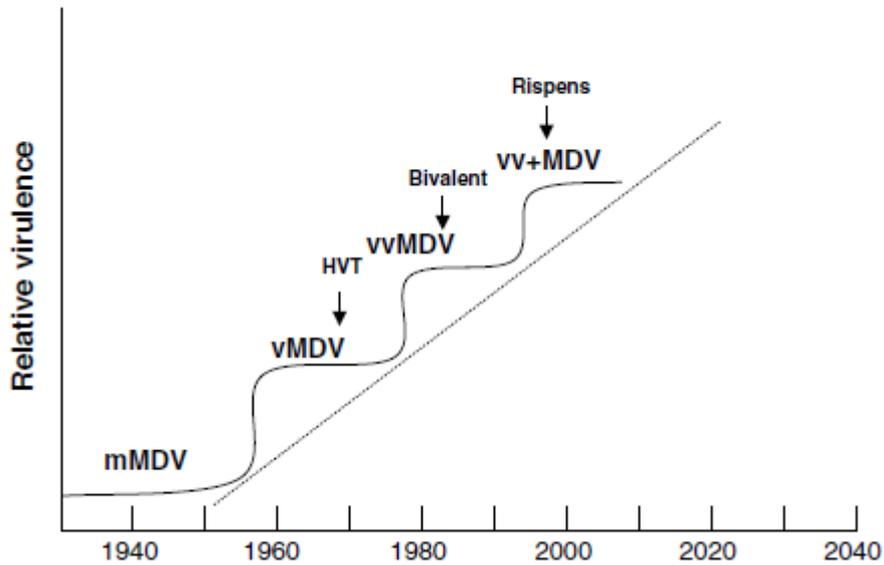


Ilustración 4: Esquema de evolución del MDV.

Fuente: Venugopal, 2004 (24) En el gráfico se aprecia la escalera de evolución de virulencia del MDV. Se puede observar la relación entre la introducción de la vacuna y el aumento en la virulencia.

Dada la fuerte asociación entre los genes del CMH¹⁶ y la susceptibilidad o resistencia a EM, se ha logrado realizar selección de aves con variantes resistentes a algunos patotipos del GaHV-2 (147).

1.2.3 Transmisión

El MDV está fuertemente asociado a células y es difícil de obtener virus libre de estas, excepto para el caso del *MeHV-1* (128). A pesar de que el MDV puede infectar todos los tejidos, el único sitio donde puede ensamblar partículas de virus infectantes es en las células ubicadas en la capa queratinizada del epitelio escamoso estratificado del folículo de la pluma, es por esto que las plumas juegan un rol de transmisión del virus y por tanto en la epidemiología de la enfermedad (121,148–151). Estas partículas infectantes se liberan en el ambiente de los galpones y constituye la fuente de infección para aves

¹⁶ Complejo mayor de histocompatibilidad

susceptibles a través de la inhalación del polvo (127); por esta razón, la principal fuente de contagio es la descamación epitelial y células presentes en las plumas, las cuales se difunden fácilmente por el ambiente (23,152). El virus relacionado con las plumas y la caspa es infectante, y el polvo contaminado de los gallineros continúa siendo infectante durante varios meses si se mantiene entre 20 a 25 °C, por lo tanto, la infección probablemente persiste de manera indefinida. Los escarabajos coquito (*Alphitobius diaperinus*) transportan de modo pasivo el virus; sin embargo, garrapatas libres en el material usado en los suelos, mosquitos y ooquistes de coccidias no pudieron relacionarse con la transmisión (23,153,154).

La excreción del virus comienza 2 días pi, y continúa indefinidamente; los signos clínicos aparecen después de 3 o 4 semanas pi. (23,154). Es difícil determinar el período de incubación de la enfermedad en condiciones de campo. A pesar de que a veces hay brotes en aves tan jóvenes como de 3 a 4 semanas, los casos más graves se inician después de las a las 9 semanas, y es imposible determinar el momento y las condiciones de exposición. Se ha notado que los signos clínicos en las parvadas de ponedoras comerciales a menudo no se aprecian sino hasta las 16 a 20 semanas, y pocas veces tardíamente como hacia las 24 a 30 semanas. También se han reportado brotes hacia la semana 60 de vida (154). Es importante resaltar que en todos los galpones en los que se evalúe presencia de DNA en pluma de *MeHV-1* se encontrará positivo, si es de una parvada vacunada, pero la transmisión horizontal a partir de esta es limitada (23,154). Se cree que no hay transmisión vertical de MDV y la contaminación externa del huevo también es improbable, debido a la pobre supervivencia del virus a la temperatura y humedad empleada para la incubación (23,154).

1.2.4 Patogénesis

Para entender completamente el mecanismo de acción del virus, se ha propuesto un sistema por fases, el cual depende del tipo de replicación que tenga el virus en las células y los signos que genere. A continuación se describen cada una de las cuatro fases:

Fase 1: Citolítica temprana

Las aves se infectan naturalmente a partir del virus libre de células que se encuentra en el folículo de la pluma. El virus penetra al organismo a través de las vías respiratorias, en donde es probablemente captado por las células fagocíticas de 24 a 36 horas pi. Este virus se transporta en los macrófagos hasta los órganos linfoides, allí se replica inicialmente en los linfocitos B causando una infección productiva restrictiva, la cual está ligada a células. Poco después puede detectarse la infección citolítica en el bazo, bolsa de Fabricio y timo, alcanzando su intensidad máxima de los 3 a 6 días. Allí se afectan solo linfocitos B y linfocitos T activados, ya que las células T en reposo son refractarias a la infección. Los efectos necrotizantes de esta infección temprana provocan una reacción inflamatoria aguda con infiltración de varias células incluyendo macrófagos, granulocitos y linfocitos. Finalmente, puede haber atrofia de bolsa y timo. Cepas *vGaHV-2*, como la *Md5*, pueden provocar una atrofia de órganos linfoides más intensa que las cepas menos oncógenas, y ocasionar un síndrome de muerte temprana como resultado de una infección citolítica (7,147,151,154).

El cuadro clásico de parálisis transitoria se observan de 8 a 18 días pi, y con cepas muy virulentas puede ocurrir desde la semana 30 a las 102. En el campo, estos signos se presentan principalmente de 6 a 12 semanas, 10 días

pi (17,23). Se ha reportado mejoría en el estado general del ave después de 8 o 14 días pi, pero la atrofia en los órganos puede ser permanente. (23,151).

Fase 2: latencia

La fase latente es el estado en el cual se presenta DNA viral, pero no transcritos o proteínas virales. Normalmente la infección está asociada con células T CD4+, sin embargo células T CD8+ y linfocitos B también pueden infectarse de forma latente dependiendo de la cepa (23). Se sabe que el virus produce inmunoevasión secuestrando el CMH¹⁷ I en el retículo endoplasmático y logra la integración de su genoma al del ave cerca al final de los cromosomas en la región telomérica. La fase de latencia comienza cerca de los 6 o 7 días, coincidiendo con el desarrollo de respuesta inmunitaria. Se ha observado que la inmunidad mediada por células es importante en el cambio de fase, ya que aporta mediadores solubles como INF γ y α . y el factor de mantenimiento de latencia (113). La infección latente es persistente y puede durar toda la vida del ave. Se desconoce el grado en que las células no linfoides están infectadas latentemente, aunque aparentemente se ha observado en células de Schwann y en células satélites en los ganglios (151).

La apoptosis de células T suele ocurrir en esta fase. Si se tiene una cepa muy virulenta (vv) puede generar una segunda oleada citolítica después de dos o tres semanas, que coincide con la inmunosupresión permanente (154).

Fase 3: infección productiva-restrictiva

Durante esta fase ocurre la replicación del DNA viral. En esta fase las proteínas son sintetizadas, y en ocasiones partículas virales son producidas. En todas las células susceptibles, la infección productiva conlleva a formación de cuerpos de inclusión intranucleares y lisis celular (24,35). No ocurre siempre ya que

¹⁷ Complejo mayor de histocompatibilidad.

depende de la resistencia genética del ave y la virulencia del MDV. Si se da, se caracteriza por focos localizados en órganos linfoides y epitelios, allí se presenta muerte celular focal e inflamación alrededor del área (7,23). Es en este momento en el que se puede dar la inmunodepresión permanente. Es importante tener en cuenta que no es necesario que haya inmunodepresión para que se desarrollen tumores (23,124).

Fase 4: Oncogénesis

Constituye la última respuesta a la enfermedad, y puede progresar a la formación de tumores. Se cree que para la transformación se necesita: susceptibilidad a la infección, control intrínseco del virus, división celular con genoma de virus integrado y expresión viral de oncogenes. Con algunas cepas se ha reportado la regresión del linfoma, pero depende de la resistencia genética del ave y la edad (123). La muerte por linfomas puede ocurrir en cualquier momento a partir de las 3 semanas. Las células transformadas son normalmente CD4+ que expresan TCR $\alpha\beta 1$ o $\alpha\beta 2$ y MCH-II. La composición de los linfomas es compleja; se reporta que está constituida por una mezcla de células neoplásicas o inflamatorias e inmunológicamente activas. Hay tanto células T como B, aunque predomina la primera. Lesiones en los nervios indican enfermedad autoinmune, aunque no siempre se puede demostrar la presencia del MDV (23). La proteína Meq es la proteína principal envuelta en la transformación de células, junto con la telomerasa viral. Pocas células transformadas expresan pp38, pero puede ser debido a que iniciaron su estado infectivo-restrictivo (23,123).

Se puede decir entonces, que los pollitos inoculados al primer día de edad excretan virus comenzando aproximadamente dos semanas posteriores a la infección (pi) con diseminación máxima entre las 3 y 5 semanas. Las infecciones citolíticas de los 3 a 6 días pi son seguidas por lesiones

degenerativas en órganos linfoides de 6 a 8 días pi. Pueden encontrarse infiltraciones mononucleares en nervios y otros órganos después de dos semanas; sin embargo, los signos clínicos y las lesiones macroscópicas se presentan solo hasta las 3 o 4 semanas. Los mismos factores que influyen en la incidencia de la enfermedad también afectan al período de incubación. Estos comprenden la cepa del virus, la dosis, el estado de los anticuerpos maternos y la vía de infección, así como la edad, línea genética y sexo del huésped (24,121,123).

Por otro lado, en el epitelio del folículo plumoso, la fase citolítica comienza al día 14 pi. Este sitio es el único conocido en el cual el virus se replica completamente. La replicación ocurre tanto en aves susceptibles como resistentes, y con cualquier cepa. Allí llega por medio de los linfocitos. El DNA de los tres serotipos puede ser encontrado a partir de 5 o 7 días. No se sabe si este DNA representa virus infectante libre de células, o DNA en la pluma, ya que los linfocitos periféricos en sangre MDV positivos se encuentran en la pulpa de la pluma a los 4 días pi, que coincide con el aumento de la transcripción de INF- γ (58). La primera proteína viral encontrada en la pulpa es la pp38 después de la reactivación, seguida por gB y gD (97).

En cuanto a la repuesta del sistema inmune humoral, después de 1 o 2 semanas pi se comienza a ver el desarrollo de anticuerpos precipitantes y neutralizantes (VN), primero como IgM transitoria, y luego reemplazada por IgY. Aun así, debido a que el virus es asociado a células, los anticuerpos son de poca importancia en esta enfermedad, y solo los VN pueden ser útiles cuando se expresan proteínas virales en las células, o cuando hay virus libre. (23,24,129).

1.2.5 Signos clínicos

Los signos clínicos de la EM incluyen inmunodepresión, polineuritis y linfomas de células T en las vísceras y piel (124). La mayoría de casos graves se presentan en aves de más de 8 semanas, pero a veces ocurre cuando están en pico de producción. Los casos más tardíos se deben probablemente a una inmunodepresión o coinfección con CIAV (23,122,124).

Los signos clínicos de la EM no son patognomónicos y están relacionados con la disfunción de nervios periféricos, generando parálisis progresiva asimétrica que se convierte en parálisis espástica. Los primeros signos que se notan son la descoordinación y tambaleo (23). La afectación del nervio del ala se caracteriza por la caída del miembro. Si se dañan los nervios que controlan a los músculos del cuello, la cabeza puede estar inclinada hacia abajo y puede haber cierto grado de tortícolis. La afectación vagal puede provocar parálisis y dilatación del buche, o jadeo. Como las perturbaciones locomotoras se reconocen con facilidad, la incoordinación y la marcha titubeante pueden ser los primeros signos observables. Una actitud en particular característica es la del ave que tiene una pata estirada hacia adelante y la otra hacia atrás como resultado de paresia unilateral o parálisis de la pata (23,122,124).

Las aves con linfomas pueden o no presentar signos pero normalmente no se evidencia ninguna anormalidad. Pueden presentar algo de sintomatología inespecífica como anorexia, depresión, y entrar en estado comatoso antes de morir. Otros signos no específicos son diarrea, palidez y pérdida de peso en aves con un curso crónico. La muerte ocurre por la incapacidad del ave para alcanzar la comida y agua, y la agresión de las demás compañeras (123).

Otra forma de presentación se da en aves jóvenes infectadas con cepas muy virulentas, y se le conoce como síndrome de mortalidad temprana, el cual se

evidencia con alta mortalidad de 8 a 16 días pi. Las aves se deprimen y entran en estado de coma antes de morir, lo cual ocurre a las 48 horas de comenzados los signos. Las aves que muestran signos clínicos rara vez se recuperan, aunque algunas pueden mostrar algo de mejoría que no es permanente (23).

Las lesiones del sistema nervioso son un hallazgo frecuente en aquellas aves afectadas. No se observan alteraciones macroscópicas en el encéfalo, pero de ordinario se pueden localizar en uno o más nervios periféricos, así como en las raíces medulares y en sus ganglios. Se deben realizar exámenes macroscópicos de diferentes nervios, los plexos celiaco, mesentérico craneal, braquial, ciático y el nervio vago cervical para llegar un diagnóstico (122).

Los nervios periféricos afectados muestran pérdida de las estriaciones cruzadas, cambio de color gris amarillo y a veces aspecto edematoso. El crecimiento localizado difuso ocasiona que la porción afectada sea de un tamaño de 2 a 3 veces mayor a lo normal y en algunos casos mucho mayor. Ya que muchas veces las lesiones son unilaterales, es en especial útil comparar los nervios opuestos en el caso de cambios ligeros (23,122).

Los tumores linfoides se pueden presentar en uno o más de diversos órganos. Pueden hallarse lesiones linfomatosas en las gónadas (en especial el ovario), pulmón, corazón, mesenterio, riñón, hígado, bazo, bolsa, timo, suprarrenal, páncreas, proventrículo, intestino, iris, músculo esquelético y piel. Los tumores pueden encontrarse en ausencia de lesiones nerviosas macroscópicas (122). Se puede encontrar tumores sin tener afecciones en los nervios (23). Es evidente el crecimiento del órgano y hay un cambio de color grisáceo. En algunas aves se encuentran crecimientos nodulares semejantes a tumores dentro del parénquima del órgano, y extendiéndose a partir de este, son firmes y lisos al corte. La afectación del pulmón origina solidificación (23).

Las lesiones en piel están asociadas a las lesiones en el folículo plumoso. Puede variar el grado de afección, desde unos cuantos, hasta regiones enteras de la piel con lesiones nodulares. Se observan como nódulos blancos, similares a costras con incrustaciones cafés. Se ha encontrado mayor afección en la región ventral y dorsal del cuello. También se ha visto edema en barba y cresta que puede ser indicativo de crecimiento tumoral en zonas aledañas (23). En el ovario inmaduro se observan áreas grisáceas y traslucidas. Los ovarios maduros mantienen su función a pesar de que haya folículos tumorales; cuando hay marcada involución se evidencia aspecto de coliflor (122).

La bolsa de Fabricio suele atrofiarse cuando se afecta, y en pocas ocasiones da origen a tumores que parecen engrosamientos difusos a causa de la distribución interfolicular de las células tumorales. Esta lesión es distinta del tumor nodular característico de la leucosis linfoide, y puede diferenciarse histológicamente con facilidad (23).

1.2.6 Diagnóstico

El diagnóstico en granja se debe basar en la clínica y los hallazgos de necropsia. Normalmente es fácil cuando se observan gran número de casos de parálisis, cojeras unilaterales, emaciación y mortalidad escalonada en el tiempo (23); sin embargo, debido al complejo cuadro clínico que puede generar, resulta difícil llegar a la conclusión de que es el agente causal.

- Técnicas serológicas y moleculares.

Los métodos de identificación de anticuerpos específicos en el suero de los pollos son de utilidad en los estudios de la patogénesis viral y para vigilar parvadas libres de patógenos específicos. Algunas de las técnicas son AGID, ELISA y NV¹⁸. Sin embargo, ninguna de estas pruebas puede determinar

¹⁸ Neutralización viral

anticuerpos para un serotipo viral específico en pollos expuestos a múltiples serotipos virales. Se han comunicado diferencias antigénicas entre serotipos, pero también parecen existir antígenos comunes. El significado biológico de los anticuerpos detectados por métodos distintos puede variar (122).

La disponibilidad de la secuencia de los tres serotipos del MDV ha permitido desarrollar la técnica de *PCR*, pero no siempre es lo suficientemente sensible para detectar infecciones latentes debido a la baja frecuencia de células positivas y el bajo número de genoma viral por célula (122). Aun así, la técnica de PCR (cualitativa, semi cuantitativa y cuantitativa) es usada actualmente para detectar el MDV identificando los tres serotipos (155–160).

En el GenBank se encuentran disponibles los genomas completos de diferentes cepas pertenecientes a los 3 serotipos (códigos de acceso para Md5; AF243438, GA; AF147806, Md11; AY510475, CVI988; DQ530348. Para MDV 2: SB-1; HQ840738, HPRS24; AB049735 y MDV 3:FC126; AF291866.). Con base a estos se diseñan iniciadores que identifican los diferentes serotipos y patotipos del MDV, y además reconocen si es oncogénico (156,160–162).

Se ha usado la PCR convencional para identificar el oncogén *Meq* en plumas y tumores (162,163). También se reporta PCR anidada para reconocer este mismo gen en células de bazo, pulpa de pluma y células mononucleares de sangre periférica (164). En el año 2012 se desarrolló PCR múltiple para la detección simultánea de MDV, Leucosis aviar y virus de la reticuloendotelosis, la cual permite diferenciar el origen de los tumores en pavos (165).

Recientemente se ha desarrollado la rtPCR¹⁹, y actualmente es el método de elección debido a que da un resultado cuantitativo, es rápido, sensible, reproducible y tiene mínimo riesgo de contaminación ya que no hay

¹⁹ PCR en tiempo real o PCR cuantitativa

manipulación del amplicon (120,166,167). La sensibilidad de la PCR en tiempo real se ha encontrado que es entre 3,5 y 10 veces mayor que la PCR convencional. Pero puede haber falsos negativos debido a pequeñas mutaciones en el gen *Meq*, cuando este es el blanco de la PCR (116).

Algunos autores han estandarizado esta técnica para usarse con los tres serotipos, ya sea por separado o todos al tiempo (128), a partir de diferentes tejidos. Estos ensayos juegan un rol importante en el monitoreo y manejo de la vacunación y reducir el impacto del *GaHV-2* (127).

Se ha demostrado una asociación cuantitativa entre la carga viral y los tumores producidos en la EM. La mayoría de aves con tumores presentan títulos altos de viremia y son positivos a PCR. Por lo tanto, si se demuestra alta cantidad de virus o DNA viral en las células tumorales y se excluye por histopatología otro tipo de tumor, este puede ser un diagnóstico específico de EM (168). Adicional a esto, con la introducción de tarjetas FTA (The Flinders Technology Associates) se ha simplificado el proceso para la toma de la muestra en campo, y ha demostrado efectividad en diferentes muestras (sangre, tumores y pulpa de pluma) para la para detección de MDV con excelentes resultados en rtPCR (168).

El valor diagnóstico de detectar genoma del MDV en el folículo de la pluma en aves infectadas naturalmente ha sido reportado (97,160). Recientemente se ha llevado cuantificación del genoma del MDV en el EFP y ha mostrado tener hasta 200 copias por célula después de 14 días de infectado con una cepa *Rispens* (120). Las lesiones del folículo plumoso asociado con la EM aparecen a los 7 días pi (153), y puede detectarse por PCR a los 14 días, que es cuando muestra su pico, y luego desciende gradualmente entre los 21 y 28 días (116). La cantidad de virus en el folículo varía mucho entre individuos, como lo han demostrado varios estudios (120,169), por lo tanto es recomendable hacer un

pool con varias plumas. Sin embargo, se debe manejar con precaución el resultado de esta prueba, ya presencia del *GaHV-2* en el folículo de la pluma de aves vacunadas es indicativo de infección pero no de enfermedad ya que el huésped normalmente no desarrolla tumores, pero aun así continua eliminando el virus (128).

Una de las últimas técnicas estandarizadas para el diagnóstico del MDV es la amplificación isotérmica mediada por *loops* (*Loop Mediated isothermal amplification, LAMP*) (170). Este es un novedoso método de amplificación de ácidos nucleicos que sintetiza grandes cantidades de DNA en poco tiempo, pero aun así, con gran especificidad (171). El LAMP demostró ser aproximadamente 100 veces más sensible que la PCR convencional para detectar MDV (170).

- Aislamiento viral

Un método más tradicional, y aun así recomendado por la OIE, 2010, es el aislamiento del virus. El MDV se puede aislar tan temprano como los 1 o 2 días posteriores a su inoculación, o cinco días luego de la exposición por contacto, y durante el transcurso de toda la vida de los pollos. Las células viables intactas son el inóculo preferido, ya que en la mayor parte de los casos la infectividad está relacionada ávidamente con células, aunque preparados libres de células de piel, caspa o puntas de plumas de pollos infectados pueden contener virus. El inóculo puede estar constituido por linfocitos sanguíneos, sangre entera heparinizada, esplenocitos o células tumorales aisladas. Muchas veces, puede aislarse el virus de suspensiones de células infectadas después de almacenamiento durante 24 horas a 4 °C, facilitándose así el transporte de muestras (122,172).

El desarrollo de placas típicas en cultivos inoculados dentro de un plazo de 5 a 14 días, y la ausencia de estos cambios en cultivos testigo, es evidencia de aislamiento de MDV. Las placas inducidas por los virus serotipo 1, 2 y 3 pueden distinguirse, con práctica, mediante un criterio morfológico. El momento óptimo para la observación de las placas varía con el sustrato celular o el serotipo del virus. Para determinar la susceptibilidad de los cultivos de prueba, se pueden utilizar inóculos infectados con virus conocidos (122,172,173).

Los fibroblastos del embrión de pato o las células de riñón de embrión de pollo (FEP) cultivados resultan adecuados para la propagación de aislamientos de MDV. El MDV atenuado y los virus de los serotipos 2 y 3 proliferan bien en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo. Los cultivos infectados suelen desarrollar lesiones focales separadas, constituidas por agrupamientos de células redondas refráctiles en degeneración cuando maduran. Las lesiones suelen ser menores a 1 mm de diámetro y de densidad celular variable. Las células afectadas pueden contener dos a varios cientos de núcleos, y se observan de ordinario cuerpos de inclusión intranucleares tipo A. A pesar de la liberación de células redondas en el medio al madurar las placas, no se observan áreas grandes de lisis celular. Se desarrollan placas de serotipo 1 luego de 5 a 14 días de aislamiento primario y de 3 a 7 días después de la adaptación al cultivo (23,172).

Se puede realizar un acercamiento al serotipo según el efecto que tenga en los cultivos celulares: el serotipo 1 crece mejor en células de embrión de pato y células de riñón de pollo, generando pequeñas placas en estos. El serotipo 2 crece mejor en fibroblasto de embrión de pollo (FEP), y produce placas de tamaño mediano y largos sincitios. El Serotipo 3 crece rápidamente FEP y produce grandes placas (23). Con estos cultivos es posible realizar también la titulación viral de los 3 serotipos, aunque el protocolo varía entre cada serotipo, y cepa que se esté analizando (122).

- Patotipificación

Para la *patotipificación convencional* de las cepas del serotipo 1, se puede realizar la inoculación de pollos no vacunados así como de pollos vacunados con vacunas HVT o bivalentes. La ausencia de otros virus es crítica, puesto que la contaminación puede alterar la patogenicidad aparente del aislamiento. Además, debe considerarse la posibilidad de atenuación, la cual requiere por lo general de 20 o más pases en cultivos celulares y sucede de manera más gradual en células renales de pollo o fibroblastos de embrión de pato, que en fibroblastos de embrión de pollo (122).

Hoy en día, esta patotipificación puede ser realizada mediante el *análisis de las secuencias del gen Meq*, alineando la secuencia probable de aminoácidos, los cuales muestran distintos polimorfismos y puntos de mutación correlacionados con la virulencia. A pesar de que la patogenicidad sea multigénica, estas mutaciones parecen ser suficientes para aproximarse al patotipo. El gen *Meq* solo se expresa en células latentes y transformadas, por lo que descarta los serotipo 2 y 3. Shamblin *et al.* determinaron sitios de mutación específicos en el gen *Meq*, que modifican el orden de los aminoácidos, lo que conlleva a cambios en la virulencia (174):

Los *mGaHV-2* muestran puntos de mutación en el amino terminal (posición 71 y 77); los *vGaHV-2* muestran una región rica en prolina; los de *vvGaHV-2* tienen mutación en el punto de repetición rico en prolina, el cual se ve interrumpido por 4 aminoácidos en la posición 2 (PPPP → P(Q/A) PPP); y el *vv+GaHV-2* muestra una substitución en el aminoácido putativo retinoblastoma (Rb) en el dominio de unión de proteína de bolsillo(Rb) LaChE'' → LaRhE (consenso LXCXE, donde X es cualquier aa) (175).

1.2.7 Epidemiología

Esta enfermedad es de distribución mundial y se asume que todas las granjas presentan por lo menos un serotipo. En algunos países se reporta la enfermedad clínica. En China por ejemplo, se ha visto que la vacunación no impide la replicación de cepas variantes de GaHV-2 presentes en el país (176).

La incidencia de la EM es muy variable. Unas cuantas aves que desarrollan signos pueden recuperarse de la enfermedad clínica, pero en general, la mortalidad es casi igual a la morbilidad. Luego de que aparece la enfermedad, la mortalidad se acumula gradualmente y persiste por lo general durante 4 a 10 semanas (23). La morbilidad y mortalidad pueden variar de acuerdo a la cepa, dosis, ruta de infección, género del ave, anticuerpos maternos, edad, ambiente y factores estresantes, pero se puede decir que va desde unas cuantas aves, hasta el 30%, incluso se ha reportado 60% (23).

En Colombia se desconoce la situación de la enfermedad, y los datos que se encuentran son contradictorios. Según un reporte en el año 2008²⁰, la EM no se reportó en ningún predio Colombiano, pero se calcularon pérdidas generadas por esta la enfermedad de 3.198.744 pesos, debido a 472 muertes asociadas por EM.

1.2.8 Vacunación.

La EM se había controlado bien con el uso de vacunas con el virus *HVT*, serotipo 2 del MDV (*GaHV-3*) o cepas atenuadas de *GaHV-2* (177). La vacuna y el virus virulento pueden coexistir en el mismo hospedero (152,178–180). Hoy

²⁰ Sistema de Información y Vigilancia Epidemiológica. COLOMBIA, SANIDAD ANIMAL 2008. INFORME TÉCNICO Bogotá, D.C., 2009

en día hay evidencia de que el uso extensivo de las vacunas ha seleccionado las cepas de MDV que tienen mayor virulencia (144).

La vacuna *HVT* libre de células tiene poca eficacia en caso de tener anticuerpos maternos, por lo tanto ha sido más usada la *HVT* asociada a células (23). Esta vacuna puede ser aplicada SC o IM en aves el día de nacimiento, o *in ovo* a los 18 días de incubación. Esta última se utiliza más que todo en pollo de engorde, y debe ser aplicada en el saco amniótico o en el embrión, para que se dé respuesta adecuada. La aplicación de la vacuna contra MDV en incubadora es de carácter obligatorio en nuestro país (Resolución ICA 3651 del 2014).

Un reciente estudio en la respuesta citolítica inducida por la vacunación del MDV muestra que la gI²¹ es un blanco potente para usar como inmunógeno tanto en líneas resistentes como susceptibles. Sin embargo, entre estos dos grupos de aves se también se observó que gE mostraba respuestas muy similares citolíticas, por lo tanto también tiene potencial para uso en vacunación (181).

La vacunación altera la patogénesis de la infección de *GaHV-2* mediante la disminución o eliminación de la fase citolítica temprana. Asimismo, se reduce notablemente el grado de infección latente con MDV, no se desarrollan la infección citolítica tardía ni la inmunosupresión. La protección inducida por la vacuna comienza con el INF γ . La inmunización con CV1988 después de 3 días pi, resulta en regulación positiva del interferón, IL-8, IL-18 e iNOS²² en los pulmones y bazo. Este mecanismo se cree que también sucede con *HVT* y *SB-1*. El interferón reduce la replicación viral y estimula los macrófagos a iniciar la transcripción de iNOS, produciéndose Nitrógeno entre 3 y 7 días después de la

²¹ Proteína de membrana I

²² óxido nítrico sintetasa inducible

vacuna, limitando así su replicación (25,122,123). Después, las células NK son activadas, y eliminan los Linfocitos B infectados. La respuesta citolítica antígeno específica comienza a los 7 días después de la vacunación, la cual junto con la fagocitosis mediada por anticuerpos y los NK, controlan la enfermedad y llevan al virus a entrar en fase de latencia. Las células citolíticas de memoria pueden eliminar rápidamente las células infectadas reactivadas (122).

Capítulo 2: Muestreo y preparación de las muestras.

2.1 Introducción

Para determinar si existen individuos infectados con un patógeno específico en una población, se debe tomar una muestra representativa que permita encontrar al menos un individuo positivo, de acuerdo a la prevalencia esperada de la enfermedad estudiada. Dado que ambos virus (MDV y CIAV) presentan distribución mundial (66,101), se asume que todas las parvadas comerciales portan ambos virus en cantidades variables.

En Colombia, los estudios sobre CIAV son pocos y se basan en la detección de anticuerpos mediante la prueba de ELISA y estudios de casos con descripción de las lesiones halladas en la necropsia (108,109). Sin embargo, no hay datos que permitan conocer con exactitud la prevalencia en Colombia; por lo tanto basados en los estudios de Venezuela, se puede asumir una frecuencia de la enfermedad por encima del 80% (182).

Por otro lado, la incidencia de la EM es muy variable. Hay una diferencia considerable de prevalencias entre países; mientras que algunos presentan mortalidad en ponedoras (Francia y Alemania), otros tienen problemas en pollo de engorde (Italia). Los países en desarrollo se consideran con alto riesgo de que la enfermedad ocurra debido a la falta de ambientes controlados, inapropiado almacenamiento de las vacunas y presencia de varias edades en la misma granja (183). Se cree que el costo de esta enfermedad a nivel mundial está entre \$1-2 billones de dólares anualmente (184). En un estudio en EEUU se determinó que la tasa de decomisos en planta de beneficio en un período de 4 años fue de 0,23%, lo que representa pérdidas considerables para el

productor. Se asume que todas las granjas presentan por lo menos un serotipo, pero sólo en algunos países se reporta la enfermedad clínica (185).

En Colombia se desconoce la situación de la enfermedad a nivel de campo, y los datos que se encuentran son contradictorios. Ya que la vacunación en incubadora es obligatoria para todas las aves, se espera que el 100% de las aves sean positivas al menos para 1 serotipo.

Con base en lo anterior, para el cálculo de tamaño de muestra de este estudio se tomó un nivel de confianza del 95% y una prevalencia esperada del 80% (87,107) para ambas enfermedades con el fin de detectar animales positivos en una población de 80.000 aves de levante.

2.2 Metodología

2.2.1 Zona de estudio

Se evaluaron 4 granjas avícolas de levante ubicadas en la región norte y oriente del Departamento de Antioquia, Colombia, específicamente en los municipios de Guarne, San Vicente, Belmira y San Pedro de los Milagros. De acuerdo con el sistema de clasificación de Holdridge, ambas regiones se encuentran en una zona de vida denominada bosque muy húmedo montano bajo, con una altura sobre el nivel del mar por encima de los 2000 metros, y precipitaciones entre los 900 mm hasta los 1800 mm anual (186).

2.2.2 Población y tamaño de muestra

Las aves del estudio pertenecen a líneas de postura semipesada (Hyline brown, Babcock, Isa Brown). Las líneas semipesadas se caracterizan por tener un peso mayor que las aves de línea liviana (1400 a 1450 gr a las 17 semanas de edad), variedad de colores del plumaje (negro, rojo, marrón) y producir

huevo con cáscara marrón; esta última característica la hace ideal para el mercado antioqueño, el cual consume preferiblemente huevo marrón.

Las granjas se escogieron con base a los siguientes criterios:

- Se encontraban ubicadas en la zona de estudio.
- Recibían aves de 1 día de edad de una incubadora certificada por el ICA.
- Aplicaban vacuna contra Marek en incubadora al día 1 de vida (*HVT + Rispens*).
- Accedían a participar voluntariamente.
- Se comprometían a participar hasta completar el estudio.
- Estaban registradas ante el ICA.
- Tenían certificación como "Granja Avícola Biosegura" (según Resolución ICA 1183 del 2010²³).
- Su propósito era venta de huevo para consumo humano directo.

Los sistemas de cría y levante de las granjas estudiadas fueron en sistema de piso, siguiendo las recomendaciones de la casa genética. El plan sanitario fue diferente para cada granja, pero cumpliendo con lo establecido por la resolución ICA 3642 del 2013. Cada granja fue libre de seleccionar el biológico, tiempo y método de aplicación.

El muestreo se realizó durante el período de febrero de 2014 a febrero 2015, con las fechas de muestreo de acuerdo al calendario de recibo de polla de cada granja. Para el muestreo se contó con la aprobación del comité de ética para la experimentación animal de la Universidad de Antioquia, mediante el acta 65 de 2010.

²³ Derogada por la Resolución 3651 del 13 de Noviembre de 2014.

2.2.3 Cálculo del tamaño de la muestra

Dado que se tienen 4 granjas en el estudio con un total de 232.000 aves, de las cuales 80.000 están en levante (20.000 de cada una de las granjas), con un nivel de confianza del 95%, y usando la fórmula de Dohoo y colaboradores, 2010: $n = (1 - (\alpha)^{1/D}) (N - ((D-1)/2))$ (187), donde: n: Muestra; α : Nivel de confianza; D: prevalencia esperada; N: población; de acuerdo con lo anterior se debe seleccionar una muestra con al menos 3 individuos para detectar en una población de 80.000 individuos al menos un animal enfermo, asumiendo una prevalencia mínima esperada del 80%. Debido a que se evaluaban 6 edades diferentes, se realizó un muestreo estratificado, lo cual representa 3 aves por edad.

El tamaño de muestra fue verificado con los propietarios de las granjas, quienes establecieron que brindaban para el estudio un máximo de 3 aves por edad debido a políticas económicas.

- Los criterios de inclusión: aves sanas que cumplieran con la edad de acuerdo al punto de muestreo.
- Los criterios de exclusión: aves con signos clínicos de enfermedad o reporte de ruidos respiratorios.

La muestra se tomó en los días 1, 15, 30, 60, 90 y 120 durante el levante. En cada edad se seleccionaron 3 aves, lo que constituye un total de 18 animales por granja y 72 aves en total. Adicionalmente, se tomaron muestras de 10 aves de traspatio de fincas de los alrededores de las granjas del estudio con el propósito de ser usadas como control sin vacunación.

A continuación se detalla la información de cada granja y tamaño de la muestra.

	Ubicación	Tamaño de la población	Día de muestreo	Muestra por edad	Tamaño de Muestra
Granja 1	<u>Zona Oriente</u> Municipio San Vicente	50.000 aves (20.000 en levante)	1, 15, 30, 60, 90 y 120 días	3 aves	18 aves
Granja 2	<u>Zona Oriente</u> Municipio Guarne	20.000 aves (20.000 en levante)	1, 15, 30, 60, 90 y 120 días	3 aves	18 aves
Granja 3	<u>Zona Norte</u> Municipio San Pedro	62.000 aves (20.000 en levante)	1, 15, 30, 60, 90 y 120 días	3 aves	18 aves
Granja 4	<u>Zona Norte</u> Municipio Belmira	100.000 aves (20.000 en levante)	1, 15, 30, 60, 90 y 120 días	3 aves	18 aves
Traspatio	Zona norte		180 días	5 aves	5 aves
Traspatio	Zona Oriente		180 días	5 aves	5 aves
			Total aves muestreadas		82

Tabla 1: Información de las granjas muestreadas

2.2.4 Toma de muestra

En cada una de las edades se escogieron al azar 3 aves clínicamente sanas, y se sacrificaron siguiendo los protocolos establecidos por la FAO (188) (Comité de Ética para la Experimentación Animal UdeA.: Acta 65 de 2010). Inmediatamente después de la muerte del animal, se tomó la muestra de sangre por medio de punción intracardiaca (entre 1 y 2 mL de sangre) con jeringa de 5 mL (21G), y se depositó en tubo vacutainer tapa lila (EDTA). Esta sangre entera se conservó a -20 °C. Las plumas se tomaron de la región del pecho, conservándose a -80 °C como un solo pool por edad. La necropsia se

llevó a cabo de forma organizada, sistemática y completa por un médico veterinario con experiencia en medicina aviar. Adicionalmente se extrajeron los órganos: timo, bazo, bursa e hígado, de los cuales se conservaron fragmentos de 0,5 x 0,5 mm en congelación a -80° C para aislamiento, y fragmentos de 0,5 x 0,5 mm en formalina bufferada al 10% para histopatología.

2.2.5 Extracción de DNA.

La extracción de DNA se realizó a todas las muestras de sangre usando el Kit QIAamp® DNA Blood and tissue (QIAGEN, cat # 69506), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La elución final fue de 120 µL.

Para las muestras de pluma se realizó un *pool* de 3 animales por edad de cada granja, ya que la cantidad de DNA extraído suele ser limitado o de mala calidad (189,190). Para la extracción de DNA del folículo plumoso, se descongelaron las muestras de pluma a temperatura ambiente; se cortaron los folículos (2 cm aproximadamente) y se realizó un corte longitudinal y luego uno transversal a 0,2 cm aproximadamente. Los fragmentos de pluma se pusieron en viales de 2 mL; se añadieron 180 µL de buffer ATL y 20 µL de proteinasa K. Se trituró con un minimacerador; se agitó con vórtex por 30 segundos y se incubó durante 1 hora a 56°C (agitando vigorosamente cada 15 minutos). A partir de este punto se continuó con el protocolo establecido por el Fabricante del Kit QUIAGEN (cat. No. 69506) (Adaptado de (116,120,127,173)).

Para verificar calidad y cantidad de DNA se procedió a realizar medición de concentración mediante Nanodrop (Thermo Scientific) y se llevó a cabo la PCR para el gen estándar del Retrovirus endógeno aviar *EAV-HP pol IN* (iniciadores H3 y H8) de la gallina (191).

2.2.6 Condiciones PCR estándar para gen de referencia

Para verificar la calidad del DNA extraído de las muestras se procedió a realizar la PCR estándar para detección del gen *EAV-HP pol IN* de la gallina (Tabla 2). La reacción se llevó a cabo en platos de 96 pozos con un volumen final por pozo de 20 μ L. La reacción contenía: 10 μ L de Go taq Mix master Green (PROMEGA®), Primer²⁴ Forward 0,4 μ M, Primer Reverse 0,4 μ M, BSA 10 μ g y 4 μ L de DNA (10 ng/ μ L). Se utilizó el programa estándar para Go Taq®, que consiste en una desnaturalización inicial de 95 °C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 50 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto, y una elongación final de 72 °C por 10 minutos.

Tabla 2: Iniciadores para gen de Referencia.

Blanco	Nombre del iniciador	Secuencia del iniciador	Tamaño de banda
Gen Referencia de la Gallina <i>EAV-HP pol IN</i> (191).	H3 Forward (5659–5678) H8 Reverse (6019–5996)	5- AACAAACACCGATTTAGCCAGC-3 5-TGGTGAATCCACAATATCTACGAC-3	360 pb

2.2.7 Electroforesis

Los productos de PCR fueron separados en gel de agarosa al 1%, preparado con buffer TBE 1X y Bromuro de Etidio (1 mg/ml). En cada pozo se sembraron 20 μ L del producto de PCR. El gel se mantuvo a 70 Voltios durante 1 hora y las bandas se visualizaron utilizando un transiluminador conectado al analizador de imágenes UV.

²⁴ Primer: iniciador

2.2.8 Preparación del BSA

Para preparar el BSA²⁵ (Albumin bovine 99% ref. A3311) se utilizó agua DEPC, y se ajustó a una concentración de 1,6 mg/mL. Esta solución fue filtrada (membrana de 0,45 µm).

En la reacción de PCR con pluma se reemplazó el agua DEPC por la solución de BSA al 0.1%, las demás condiciones se conservaron.

2.3. Resultados

2.3.1 Cantidad de DNA de las muestras

Se obtuvo un total de 82 muestras de DNA de sangre con una concentración promedio de 170,94 ng/µL, y una desviación estándar de 33,85 ng/µL (mínimo de 14,8 y máximo de 218 ng/µL). Para pluma, se obtuvieron 24 muestras de DNA con un promedio de 347,2 ng/µL, con una desviación estándar de 314,72 ng/µL (mínimo de 8,1 y máximo de 1017). La relación 260/280 se mantuvo entre 1,7 y 2.1.

2.3.2 Calidad de DNA de las muestras.

Todas las muestras amplificaron una banda de 360 pb del gen de referencia de gallina *EAV-HP pol IN (H3 y H8)* (Imagen 1), confirmando así la calidad del DNA de la muestra y ausencia de inhibidores de la PCR (191)

²⁵ Bovine Serum Albumin

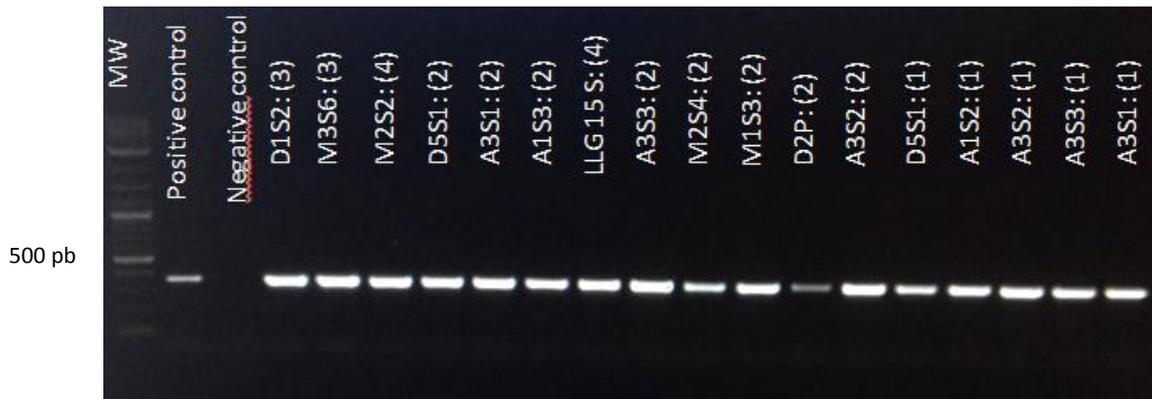


Imagen 1: Electroforesis del producto de PCR H3 y H8 (Gen de referencia) de algunas de las muestras. Control positivo DNA de FEP. Control negativo sin DNA. MW= Marcador de peso molecular de 100 pb. Banda esperada 360 pb. Líneas 3 a 17: muestras. Las letras corresponden a un código de granja. Gel de Agarosa 1%.

2.4 Discusión.

EL gen *EAV-HP pol IN* se ubica en la posición 5659-5679 (iniciador H3) y 6019-5996 (iniciador H8) y codifica el retrotransposon aviar EAV-HP (Avian Endogenous Retrovirus), cuyo hospedero es el *Gallus gallus domesticus* (191). Se ha utilizado como gen de referencia para PCR ya que está presente en todas las células de origen de gallina. Esta técnica permite evaluar si hay presencia de inhibidores de PCR o si el DNA está en malas condiciones. Al amplificar correctamente el gen de referencia, se puede inferir que el DNA extraído de las muestras tiene buena calidad y cantidad para ser usado para pruebas moleculares de diagnóstico de los patógenos deseados.

En el caso de las muestras de pluma se encuentra un inconveniente a la hora de realizar una PCR: el contenido alto de melanina. La melanina es un pigmento derivado del aminoácido tirosina, el cual puede interferir con la actividad de la DNA polimerasa (192). Cuando se trata de aves marrones o negras, el contenido de melanina en el folículo de la pluma es alto y puede interferir con la PCR, generando falsos negativos y por lo tanto sub-diagnosticando la presencia del virus (127). A pesar de que la melanina tiene

este efecto inhibidor de la PCR, puede ser corregido con el uso de algunos protocolos: pre- incubación del DNA con BSA²⁶ (160) y uso de BSA en la reacción de PCR como reemplazo del agua DEPC (120). Con este varios autores han encontrado buenos resultados incluso en la prueba rtPCR. Se utiliza añadiendo 10 ug de BSA en la reacción para una concentración de DNA de 50 a 500 ng.

2.5 Conclusiones.

Con el tamaño de muestra y calidad del DNA fue posible continuar con las pruebas de detección molecular del virus de la Enfermedad de Marek y Anemia Infecciosa Aviar, con un nivel de confianza del 95% de encontrar al menos un animal positivo a ambos virus.

Además, las muestras de sangre y pluma procesadas y analizadas demostraron ser aptas para ser usadas en la PCR para la detección de los agentes virales del presente estudio.

²⁶ Bovine Seric Albumin

Capítulo 3: Estandarización de cultivos primarios de embrión de Pollo.

3.1 Introducción

Para el cumplimiento de los objetivos de aislamiento viral y PCR fue necesario establecer un cultivo primario de embrión de pollo, con el fin de obtener células viables que permitieran el crecimiento y replicación del MDV, el cual puede ser usado como control de PCR convencional, determinar la curva normal de la PCR en tiempo real, y además verificar si hay partículas virales infectivas en las muestras evaluadas.

Los cultivos primarios son aquellos cultivos preparados directamente a partir de un tejido u órgano. En estos cultivos las células conservan sus características originales y su proliferación es limitada (193). El cultivo celular tuvo su origen en el siglo XIX, como método para el estudio del comportamiento de las células animales libres de las variaciones sistémicas y bajo el estrés de un experimento. En la actualidad pueden cultivarse en el laboratorio células procedentes de una amplia gama de tejidos y organismos diferentes (194). Los embriones de pollo se utilizan para obtener células mesenquimales para el uso en cultivo viral y producción de vacunas. Dependiendo de la edad del embrión, es posible separar por órganos y realizar cultivos con células específicas, como miocitos, células cardíacas, epiteliales, hepatocitos etc.

Algunas técnicas que utilizan cultivos celulares primarios de embrión de pollo dentro de su metodología son: la clasificación viral por patotipos, titulación viral y ELISA. Estas técnicas tienen su fundamento en los cultivos celulares, por lo tanto dependen completamente de la calidad de las células y su viabilidad para obtener resultados confiables y reproducibles. Debido a esto, se hace necesario estandarizar el proceso de cultivo de células primarias de embrión de

pollo para posteriormente realizar aplicaciones en las pruebas diagnósticas para virus aviares, específicamente para el aislamiento del MDV.

3.2 Metodología

La técnica que se describe a continuación es adaptada a partir de los protocolos usados en el laboratorio de la doctora Holly Sellers y la Doctora Maricarmen García del Poultry Diagnostic and Research Center (PDRC). University of Georgia, Athens. GA.

En Colombia es necesario el permiso del comité de ética para uso de huevos o aves para realizar cultivos celulares con fines experimentales. Para este estudio se contó con la aprobación del comité de experimentación animal de la Universidad de Antioquia mediante el acta 92 de 2014.

3.2.1 Cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo.

Los fibroblastos se obtuvieron a partir de huevos embrionados de pollo SPF²⁷ de 11 días de edad provenientes del Laboratorio Bioara (Cundinamarca, Colombia). El huevo de embrión de pollo se observó a contra luz para constatar que el embrión estuviera vivo. Se localizó la cámara de aire y se delineó con un marcador. Se desinfectó la cáscara del huevo con alcohol al 70% en la zona de la cámara de aire. Se rompió y retiró la cáscara con una pinza de disección con garra. Con una pinza mosquito recta se rompió la membrana coclear y se extrajo el embrión, sin tocar el saco vitelino. Se retiró cabeza y patas, dejando solo tórax y abdomen. Se lavó con PBS 1X estéril. Después del lavado, el embrión se introdujo en una jeringa de 10 mL y se ejerció presión con el embolo para macerarlo por completo. Este macerado se colocó en una beaker estéril y se añadió 10 mL de tripsina 0.25% pre-calentada a 37 °C. Se añadió un imán estéril y se llevó a incubación a 37 °C durante 10 minutos en agitación

²⁷ Specific Pathogen Free= libre de patógenos específicos.

constante. Este digerido se tamizó y se pasó a un beaker con 10 mL de suero bovino. El filtrado se pasó a un tubo Falcon. Se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 10 mL de medio de cultivo. Después se transfirió a un Frasco T 75 y se añadió 5 mL de Medio de cultivo (DMEM, powder, high glucose, GIBCO®. Cat. Number: 12100-046) con SFB al 10% (Suero fetal bovino. Gibco. Ref 12483-020) y AA 2% (Antibiótico- Antimicótico 100X. Gibco. Cat 15240-096). Se llevó a incubación a 37 °C y con 5% de CO₂. El frasco se marcó con fecha, nombre del cultivo y pase.

3.2.2 Cultivo primario de riñón, hígado y bursa a partir de embrión de pollo.

Los órganos internos del embrión de 18 días fueron retirados y puestos en platos de Petri con PBS al 5% AA. Los órganos se cortaron con una cuchilla y se lavaron tres veces con PBS de manera individual. Luego se llevaron a caja de petri con tripsina al 0.25% pre calentada a 37 °C (10 mL por órgano). Se añadió un imán estéril para agitación y se llevó a incubación a 37 °C durante 10 minutos en agitación constante. Este digerido se tamizó y se depositó en un volumen de 10 mL de suero bovino. El filtrado se pasó a un tubo Falcon. Se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 10 mL de medio de cultivo. Se transfirió a un Frasco T 75 y se añadieron 5 ml de medio de cultivo con SFB al 10% y AA 2%. Se incubó a 37 °C, con 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa.

3.2.3 Descripción morfológica

Se evaluó cada tipo de cultivo por medio de microscopio invertido en los objetivos de 10 y 40 X. Se tuvo en cuenta la forma (redonda, alargada, poligonal, estrellada), el grado de confluencia (esparcidas, sub confluentes, confluentes, densas), el color (claro, pardo, oscuro) el estado de la célula

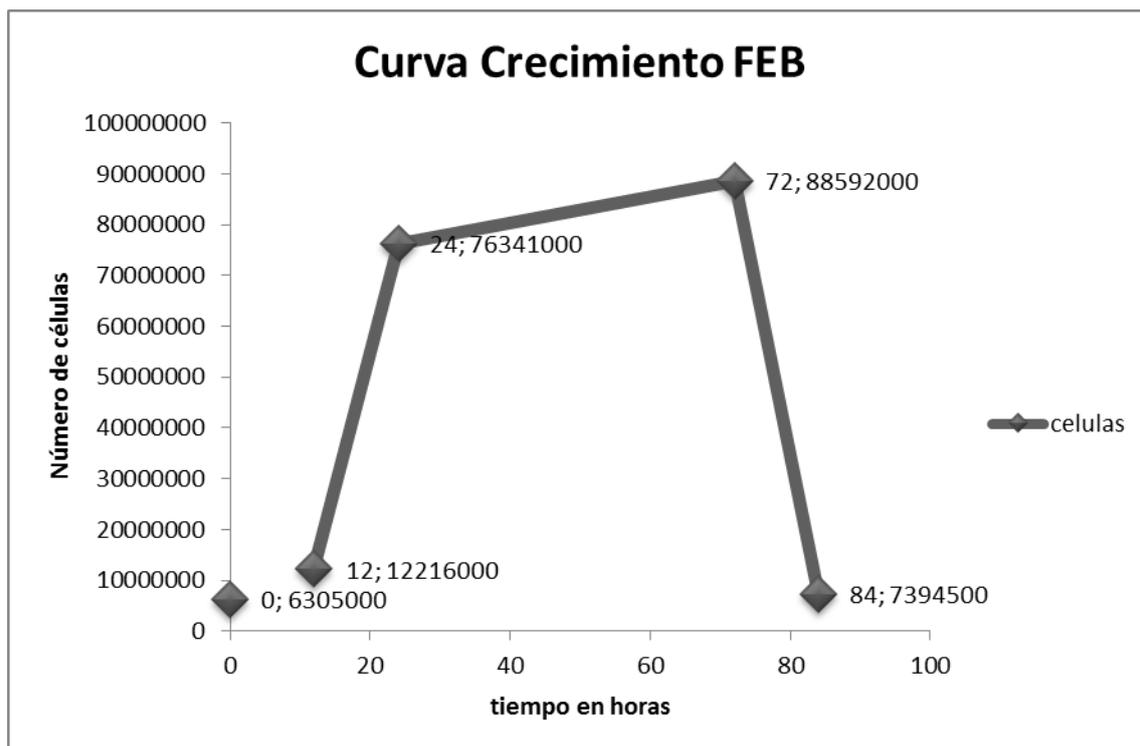
(limpia, vacuolada, o granular), tipo de crecimiento (multipolar, bipolar), y características del medio (ausencia de detritos, gránulos, contaminación).

3.3 Resultados y discusión.

3.3.1 Establecimiento del cultivo primario de embrión de pollo.

a. Fibroblasto de embrión de pollo (FEB)

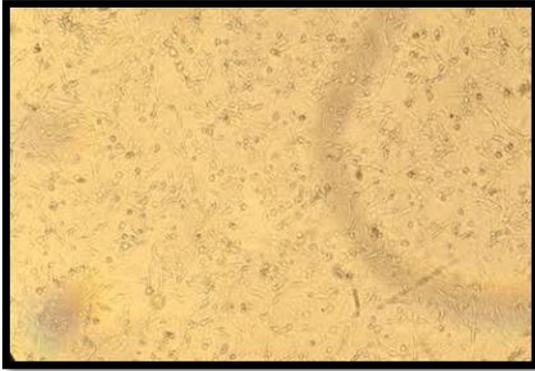
Con la metodología planteada se obtuvieron en total 6.305.000 células a partir de 4 embriones de 11 días de edad, con una viabilidad del 94,6%. A continuación se observa la curva de crecimiento de 0 a 90 horas (Gráfica 1). La densidad de siembra fue de 630.000 células por mL.



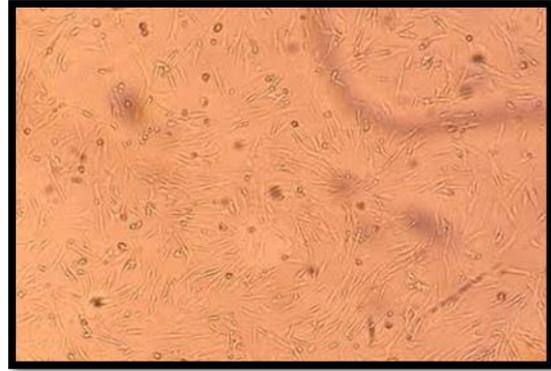
Gráfica 1: Curva de crecimiento FEB. Eje horizontal Tiempo en horas. En el eje vertical se muestra el número de células que se obtuvo en el conteo por cámara de Neubauer.

Se observa la curva de crecimiento característica de un cultivo celular (195) con una fase exponencial entre las 10 y las 20 horas de siembra. A las 12

horas la morfología de la célula fue de tipo fibroblasto, sub confluentes, color traslúcido, forma alargada, bipolar, limpia, con algunos gránulos en el medio (Tabla 3 A y B), se evidenció además una rápida adaptación y crecimiento a las condiciones *in vitro*. Esto concuerda con la descripción típica del FEP.



*A. Fibroblastos de embrión de pollo
vista 100X*



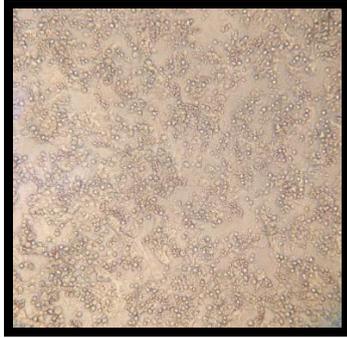
*B. Fibroblastos de embrión de pollo
vista 400X*

Tabla 3: Panel de imágenes de FEP. En las fotografías se observan los FEP a las 12 horas pos cultivo. Características: baja confluencia, células alargadas, bipolares, algunas con apariencia estrellada y de color transparente.

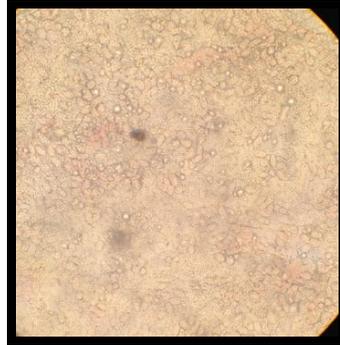
Se observa que después del pasaje 5 el fibroblasto pierde viabilidad y tiene un crecimiento mucho más lento, además se aumenta el riesgo de contaminación.

b. Células de riñón de embrión de pollo.

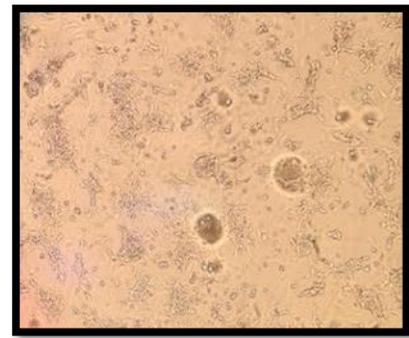
A partir de un riñón de embrión de pollo de 18 días de edad se obtuvo un total de 657.500 células, las cuales presentaron fase de crecimiento exponencial entre las 120 y 180 horas. Una adaptación y crecimiento más lento a las condiciones *in vitro* que se vieron en los fibroblastos.



A. *Células de riñón de embrión de pollo 400x.*



B. *Células de hígado de embrión de pollo. 10X.*



C: *Células de Bursa de embrión de pollo. Vista 10X.*

Tabla 4: Panel de imágenes de Células de embrión de pollo. A. Células redondas con formación de islas, coloración parda, multipolar, abundantes detritos y eritrocitos. Se observan algunas células fibroblásticas. B. Células cilíndricas o cuadradas de color pardo. Multipolares. Algunos detritos refringentes en el medio. Se observaron algunos fibroblastos. C. La composición del cultivo es heterogénea, con abundantes fibroblastos y algunas células epiteliales. Células esparcidas, color traslucido, granulares y multipolares.

Se observó que después de la elaboración del cultivo se presentaban abundantes eritrocitos en el medio, por lo que fue necesario realizar cambio de éste 12 horas después de sembrarlas. La densidad de siembra fue de 200.000 células por mL (Tabla 4 A).

Las células de riñón presentaron un crecimiento más lento que las células de FEP, lo que puede ser consecuencia de que se obtuvo a partir de un sólo órgano (10 veces menos células que en el de fibroblastos) y a que son células que exigen otros factores de crecimiento para su mantenimiento *in vitro* (196).

Para obtener mayor número de células y viabilidad en un cultivo primario se ha propuesto el uso de la técnica de digestión enzimática en frío; este método ha demostrado mayor viabilidad a las 24 horas y preserva más tipos de células que el método tradicional (194). Otro método para la obtención de mayor número de células es utilizar huevos de embrión de pollo de 12 días de edad, en los que el órgano es de mayor tamaño, y por tanto hay más tejido para ser digerido.

c. Células de Hígado de embrión de pollo.

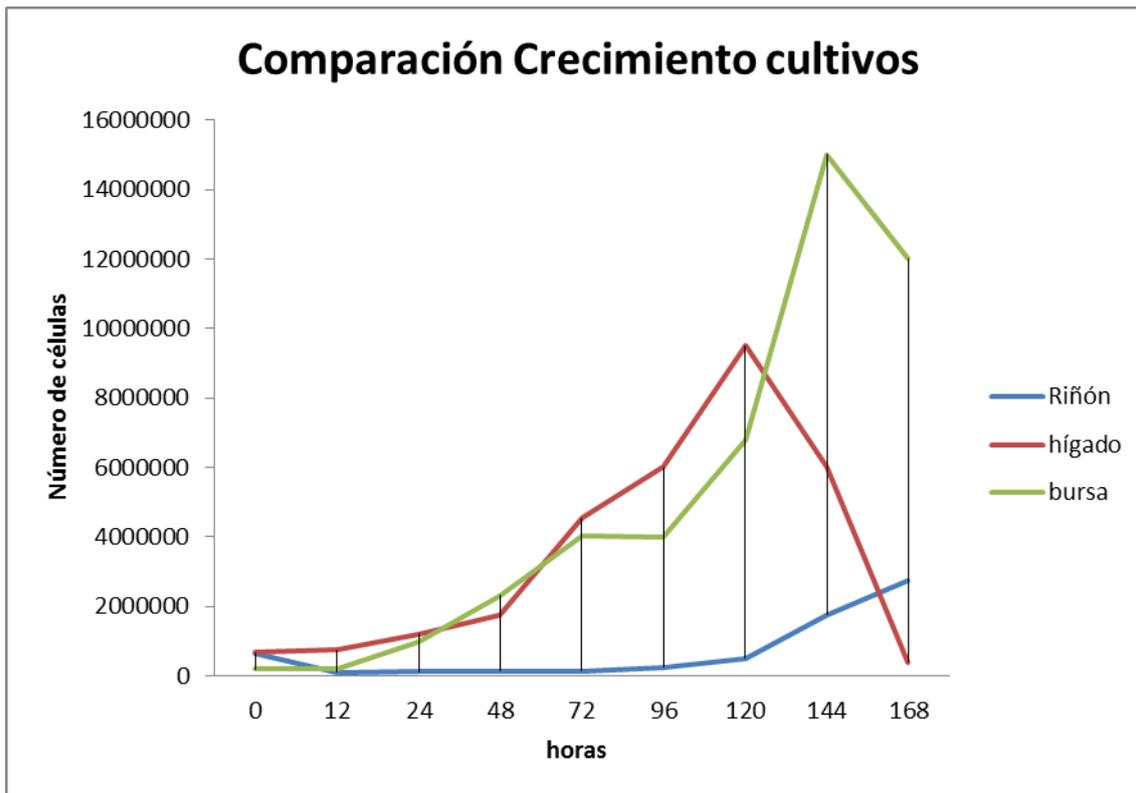
A partir de fragmentos de 6 hígados de embrión de pollo se obtuvieron 670.000 células, las cuales presentaron crecimiento exponencial entre las 50 y 120 horas de cultivo. Se observó que después del pasaje número 3, las células pierden viabilidad, capacidad de adherencia y crecimiento después de la tripsinización. La densidad de siembra inicial fue de 200.000 células por mL (Tabla 4 B).

Al igual que las células de riñón, se observó que después de la elaboración del cultivo quedan abundantes eritrocitos en el medio, por lo que es necesario realizar cambio de este, 12 horas después de sembrarlas. A pesar de que el número de células obtenidas también fue bajo, las células lograron adaptarse con facilidad a las condiciones *in vitro* y se replicaron rápidamente.

En algunos casos se puede utilizar el método físico para la obtención de células de órganos blandos, usando un tamiz de 1mm por el cual se hace pasar el tejido, después se pasa por uno de menor calibre (100 μm), y para finalizar por uno de 20 μm . La viabilidad con este método es inferior a la de la enzimática (194).

d. Células de Bursa de embrión de pollo.

A partir de fragmentos de 1 bursa se obtuvieron 182.500 células, las cuales presentaron crecimiento exponencial entre las 72 y 140 horas de cultivo. Las células se sembraron en un solo pozo, a 160.000 cel/mL. (Tabla 4 C).



Gráfica 2: Curva de Crecimiento para células de Hígado, Bursa y Riñón de embrión de pollo.

Se observa el número de células en el tiempo de tres cultivos diferentes de embrión de pollo.

Se observa una adaptación similar para los cultivos de hígado y bursa, los cuales duplican su número a las 48 horas, mientras que las de riñón lo logran solo hasta las 144 horas sometidas a las mismas condiciones de incubación y con el mismo medio de cultivo.

Normalmente, los cultivos celulares primarios tienen una vida finita que, según el tipo de célula, se puede prolongar entre 20 y 100 generaciones. Superado ese límite, las células entran en una etapa que se denomina senescencia en la que pierden su capacidad de proliferar, supuestamente por el acortamiento de los telómeros, y mueren (194).

3.4 Conclusiones

Se logró establecer un cultivo primario de diferentes células de embrión del pollo, mediante técnica de digestión enzimática. Además de mantenerse

viables por un período de más de un mes sin contaminación bacteriana (con máximo 11 pasajes). Este resultado es atribuible al entrenamiento y asesoría de expertos en el tema de biología celular. La estandarización del cultivo celular, y mantenimiento de la viabilidad de las células es un paso fundamental para realizar pruebas como aislamiento viral, ya que dependen de la calidad y cantidad de células que se obtengan. Las células de fibroblasto de embrión de pollo y riñón de embrión de pollo fueron utilizadas para llevar adelante el aislamiento del MDV, además para el crecimiento y replicación del virus control.

3.5 Agradecimientos

Al laboratorio Bioara S.A por proporcionar los huevos SPF del estudio y al PDRC de la Universidad de Georgia que proporcionó entrenamiento en las técnicas de cultivo.

Capítulo 4: Caracterización molecular del Virus de la Enfermedad de Marek en muestras de sangre y pluma de aves de levante de postura comercial en Colombia.

4.1 Introducción

La EM tiene importancia económica a nivel mundial y hace parte de las enfermedades en la lista B de la OIE²⁸ (24). Actualmente la enfermedad clínica no es común debido a que la vacuna es efectiva, pero la afección subclínica sigue siendo un problema para la avicultura moderna (183); comercialmente se encuentran disponibles tres tipos de biológicos contra MDV: serotipo 1 atenuado (GaHV-2), serotipo 2 (GaHV-3) y serotipo 3 (MeHV-1), estas dos últimas son naturalmente avirulentas para las gallinas y generan inmunidad contra algunas cepas de serotipo 1 (190). Cuando se aplica la vacuna, se genera una infección permanente que permite el desarrollo de inmunidad protectora contra la formación de tumores y mortalidad, pero no impide la infección, replicación o eliminación del virus de campo (25,151). Es por esto que es posible encontrar que las aves de parvadas comerciales están infectadas tanto con cepas vacunales como con cepas de campo de GaHV-2.

Es de gran utilidad clínica medir simultáneamente el virus vacunal y el de campo en las aves de lotes comerciales para determinar la eficacia de la vacuna (190), interferencia de la replicación del virus de campo, identificar casos de fallas en la vacunación (197) y detectar infección con cepas muy virulentas del GaHV-2 (129).

El diagnóstico de la enfermedad de Marek se basa en hallazgos de necropsia, histopatología, detección de anticuerpos, análisis de DNA viral y confirmación

²⁸ Organización mundial de la salud animal. Lista de enfermedades de la OIE en vigor en el 2006.

por intento de aislamiento (23,198). Para diferenciar entre los serotipos se utilizan diversas técnicas, entre ellas la PCR en tiempo real (rtPCR), la cual es una prueba altamente sensible para cuantificación absoluta de GaHV-2²⁹, GaHV-3³⁰ y MeHV-1³¹ (120,127,199). La rtPCR permite detectar la cantidad de genoma viral, diferenciando por serotipos y algunas cepas virulentas dentro GaHV-2 (190). Otra técnica empleada es la PCR estándar, la cual detecta aves positivas, serotipos circulantes y además permite un acercamiento al establecimiento del patotipo (200). Esto último es debido a que el GaHV-2 contiene secuencias repetidas del gen ULa, el cual está relacionado con la oncogénesis. Cerca de la región TRL e IRL del genoma (Región repetitiva del genoma de MDV) se encuentra una región que codifica para numerosos transcritos que se traducen en proteínas importantes para la inducción y mantenimiento de la latencia y transformación de las células. Algunos de estos transcritos poseen regiones de 132 pb que se repiten, esta es una particularidad del genoma de MDV, y muestran un incremento en su número después de pasajes seriados en cultivo celular, lo cual podría ser asociado con la atenuación del virus, es decir, mientras más repeticiones más atenuado el virus. Sin embargo, otros autores no han llegado a la misma conclusión (24), algunos estudios han usado esta región para la diferenciación de las cepas del serotipo 1, mediante el análisis de repetición de fragmentos de 132 pb en el gen, el cual muestra que las cepas más patogénicas solo presentan una o dos repeticiones de la banda de 132 pb, mientras que las menos patogénicas muestran entre 6 y 7 repeticiones.

EL objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de los 3 serotipos del MDV mediante PCR y rtPCR en muestras de pluma y sangre de aves de 6 edades en el levante provenientes de granjas comerciales, para establecer los niveles

²⁹ MDV-1: Marek Disease Virus 1= serotype 1

³⁰ MDV-2: Marek Disease Virus 2= serotype 2

³¹ HVT: Herpes Virus Turkey= serotype 3

del virus y el porcentaje de aves infectadas en cada edad, además de determinar el patotipo circulante.

4.2 Metodología

Se evaluaron 4 granjas del norte y oriente de Antioquia (remitirse al capítulo 2, apartados 2.2.2 y 2.2.3).

4.2.1 Material biológico

a. Virus.

Como control positivo para la PCR de MDV se usó DNA de la cepa *Rispens CVI-988* (GaHV-2), virus *herpes* de pollo *SB1* (GaHV-3) y cepa *FC 126* (MeHV-1)³² proveniente de vacunas comerciales. A éstas vacunas se les extrajo el DNA empleando un kit comercial y siguiendo las recomendaciones del fabricante (DNeasy Blood & Tissue Kit. QIAGEN cat # 69504).

b. Estándares de DNA (FEP³³) y dilución del virus.

Se utilizaron los virus estándar proporcionados por el Instituto de Pirbright, en Inglaterra.

4.2.2 PCR convencional

a. Serotipo 3 (MeHV-1)

Para el Virus de la Enfermedad de Marek serotipo 3 (MeHV-1), se usaron los iniciadores 5'-AAGCGCTTGTATGTGTAGG-3' (sentido) y 5'-TATGGACGTCATGCAGTTGG-3' (reverso) que amplifican la región *Sorf 1* (199), con un tamaño de banda de 350 pb. La reacción se llevó a cabo en un

³² Vacuna Marek Rispens HVT®-Laboratorios Merial, (Registro ICA 3735).

³³ Fibroblasto de embrión de pollo

volumen final de 25 µL utilizando 400 mM de dNTP, 1 mM de cada iniciador, 4 mM de MgCl, 1X de Buffer PCR, 2,5 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen) y 1 µL de DNA (40 ng/µl). Las condiciones de amplificación fueron una desnaturalización inicial de 94 °C durante 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 94 °C por 1:30 minutos, 60 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos, y una extensión final de 72 °C por 10 minutos.

b. Serotipo 2 (GaHV-3)

Para el serotipo 2 de la EM (GaHV-3) se emplearon los iniciadores 5'-AACCGTGATCCGTCTAGAACC-3' (sentido) y 5'-GTTACGCTTGACTGGAAGGC-3' (reverso) que amplifican un fragmento de 669 pb, correspondientes al gen *MDV gB B1-B2* (201). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL utilizando 400 mM de dNTP, 1 mM de cada iniciador, 4 mM de MgCl, 1X de Buffer PCR, 2,5 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen) y 1 µL de DNA (40 ng/ µL). Las condiciones de amplificación fueron una desnaturalización inicial de 94 °C durante 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 1:30 minutos, 52 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos, y una extensión final de 72 °C por 10 minutos.

c. Serotipo 1 (GaHV-2)

En el caso de serotipo 1 de EM (GaHV-2) se utilizaron los iniciadores 5'-ATGTCTCAGGAGCCAGAGCCGGCGCT-3' (sentido) y 5'-GGGGCATAGACGATGTGCTGCTGAG-3' (reverso) que amplifican una región del gen *Meq* (162) con un tamaño de banda esperado de 1062 pb para cepas MDV 1 y de 1240 pb para la cepa CV1988. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL utilizando 400 mM de dNTP, 1 mM de cada iniciador, 4 mM de MgCl, 1X de Buffer PCR, 2,5 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen) y 1 µL de DNA (40 ng/µL). Las condiciones de amplificación fueron las

siguientes: una desnaturalización inicial de 94 °C durante 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 1:30 minutos, 57 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos, y una extensión final de 72 °C por 10 minutos.

Para diferenciar las cepas patogénicas de las no patogénicas en los aislamientos de GaHV-2, se utilizaron las secuencia de nucleótidos de BamHI-H y BamHI-D las cuales flanquean la zona de repetición de 132 pb en el genoma viral (97,156). Los iniciadores utilizados fueron el sentido (forward) 5' TACTTCCTATATAGATTGAGACGT (24 mer) y reverso (reverse) 5' GAGATCCTCGTAAGGTGTAATATA (24 mer). El iniciador sentido (forward) está ubicado en la región de 65 pb 5' hasta el sitio de repeticiones en 132 pb, el iniciador reversa (reverse) está ubicado 10,5 pb por debajo de la región. Ambos amplifican un segmento de 434 pb en el caso de que haya solo dos repeticiones de 132 pb. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20µl utilizando 60 pM de cada dNTP, 20 pM de cada iniciador, 2 mM de MgCl, 1X de Buffer PCR, 2,5 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen) y 500 ng de DNA. Las condiciones de la amplificación fueron una desnaturalización inicial de 94 °C durante 5 minutos, seguida por 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minutos, y una extensión final de 72 °C por 10 minutos.

Tabla 5: Resumen de iniciadores para PCR de MDV.

<u>Blanco</u>	<u>Primers</u>	<u>Fragmento</u>	<u>Autor</u>
GaHV-2 Gen <i>meq</i>	5'-ATGTCTCAGGAGCCAGAGCCGGCGCT-3' (sentido) 5'-GGGGCATAGACGATGTGCTGCTGAG-3' (reverso)	1062 pb	Lee et al., 2000
GaHV-2 Gen <i>meq2</i> (secuenciación)	5'-CCGCACACTGATTCCTAGGC-3' (sentido) 5'-AGAAACATGGGGCATAGACG-3' (reverso)	1148 pb (RB1B) 1325 pb (Rispens)	
GaHV-3 gB B1- B2	5'-AACCGTGATCCGTCTAGAACC-3' (sentido) 5'-GTTACGCTTGACTGGAAGGC-3' (reverso)	669 pb	Cho et al., 1999

MeHV-1	5'-AAGCGCTTGTATGTGTAGG-3' (sentido)	350 pb	Islam et al., 2006
sorf 1	5'-TATGGACGTCATGCAGTTGG-3' (reverso)		
BamHi-H y BamHi-D Patotipificación	5' TACTTCCTATATAGATTGAGACGT-3' 5' GAGATCCTCGTAAGGTGTAATATA-3'	434 pb	

4.2.3 Electroforesis

Los productos de PCR fueron separados en gel de agarosa al 1%, preparado con buffer TAE 1X³⁴ y Bromuro de Etidio (1mg/mL). En cada pozo se sembraron 7 µL del producto de PCR mezclado con 2 µL de buffer de carga 6X³⁵ (Thermo Scientific). El gel se mantuvo a 70V³⁶ durante 1 hora y las bandas se visualizaron utilizando un transiluminador conectado al analizador de imágenes UV con Gel Capture Acquisition Software (Bio imaging systems).

4.2.4 Extracción y purificación de producto de PCR a partir de gel de Agarosa

Para secuenciar los productos de amplificación, las bandas encontradas en el gel de la electroforesis se cortaron de forma individual con cuchilla de bisturí estéril. Cada segmento fue puesto en un vial de 2 ml y se dejó en baño maría a 56 °C hasta su fusión. Se utilizó el QIAquick Gel Extraction Kit (cat # 28704) para obtener el DNA de la banda, siguiendo las recomendaciones del fabricante (202). El producto se refrigeró a 4 °C hasta su envío para secuenciación.

4.2.5 Secuenciación

Los oligonucleótidos de secuenciación fueron diseñados para amplificar el segmento completo que codifica para la proteína *Meq*, usando el Software 2.0 PyroMark Assay Design (Qiagen) (ver tabla 5). Se seleccionaron las muestras

³⁴ Buffer Tris 40 mM, Ácido acético, EDTA 2 mM

³⁵ 6X DNA Loading Dye. R0611

³⁶ Voltios

que fueron positivas para serotipo 1 y que presentaron una banda fuerte en la PCR para *Meq*, además de una concentración de más de 1ng/ μ L de DNA en el producto amplificado. Las bandas purificadas fueron enviadas con una concentración de 1 ng/ μ L por cada 100 pb a Source Bioscience, UK, (<http://www.sourcebioscience.com/>) para ser secuenciadas por el método de Sanger.

4.2.6 Ensamblaje

Los resultados de la secuenciación fueron ensamblados y editados, obteniéndose una longitud total de 1020 pb usando el programa Seqman (*DNASTar Lasergene software package, Madison, WI, USA*). El código de acceso para las secuencias del gen *Meq* utilizadas se resume en la tabla 10. Para explorar la homología de las secuencias colombianas con otras reportadas a nivel mundial se corrió BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para nucleótidos en la NCBI, los nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida, junto con otras secuencias de la NCBI fueron alineados usando el algoritmo Muscle de MEGA 6.0, y las distancias no corregidas (p) para nucleótidos y aminoácidos fueron calculadas.

4.2.7 PCR en tiempo real (RT-PCR)

Esta técnica fue realizada en el Instituto de Pirbright, UK, en colaboración con el Doctor. Nair y la Doctora Baigent, quienes realizaron estandarización de la prueba en el año 2005. Con la RT-PCR se logró establecer el número de copias de virus que se encontraban en las muestras positivas a MDV, lo cual es indispensable para monitoreo de la circulación viral. De cada una de las muestras de DNA se agregaron 50 μ L en tarjetas FTA TM (Microcard Cat No WB120210) y fueron enviadas al instituto Pirbright,³⁷ UK, Laboratorio de Virus

³⁷ Laboratorio de Referencia OIE para la enfermedad de Marek.

Oncogénicos, para realizar el análisis por PCR en tiempo real. Las condiciones de la rtPCR y los controles usados (diluciones del virus) fueron los del laboratorio de referencia de MDV (Instituto de Pirbright), para información sobre elaboración de controles remitirse al artículo de Baigent *et al.* 2005.

a. Extracción de DNA a partir de tarjetas FTA.

Se cortó un rectángulo de 1cm x 0,5 cm en el centro de la tarjeta con una tijera estéril y se puso en un vial de 1.5 mL estéril. Se añadieron 50 µL del *Buffer AE* (*Buffer* de elución del *DNeasy blood and tissue Kit Qiagen* cat # 69504) directamente sobre el papel. Se incubó 10 minutos a 37° C y luego se centrifugó a 13000 rpm durante 3 minutos. Se retiró el papel FTA y se procedió a purificar con el *QIAquick PCR Purification Kit* (Cat # 28104): se añadió 250 µL de *Buffer B* al DNA y luego se aplicó vórtex por 10 seg. Se añadieron 10 µL de Sodium Acetate (pH 5,0 3M. SIGMA) y se pasó la mezcla a la columna. Se centrifugó a 8000 rpm durante 60 segundos. Se adicionaron 750 µL del *Buffer PE* (*Washing Buffer*) y se centrifugó. Se descartó el líquido resultante en el tubo recolector, y se centrifugó nuevamente para eliminar cualquier residuo del *Buffer* de lavado. Se puso en un nuevo vial de 1.5 mL y se añadió 50 µL de *Buffer PE*, se centrifugó por última vez y se descartó la columna. El DNA se refrigeró a 4 °C hasta su análisis. Para verificar calidad y cantidad de DNA se procedió a realizar medición de concentración mediante Nanodrop (Thermo Scientific) y se llevó a cabo la PCR para el gen estándar *H3* y *H8* de la gallina.

b. Control endógeno de la rtPCR:

Como control endógeno de la rtPCR se detectó el gen de la *Ovotransferrina* (203).

c. Iniciadores

Se usaron los iniciadores y sondas diseñados específicamente para gen *Meq* (serotipo 1), gen *DNA pol* (serotipo 2) y *gen SORF* (serotipo 3) (190):

Tabla 6: *Iniciadores* y sondas utilizados en la rtPCR y PCR

Blanco	Oligonucleotido	Secuencia 5' - 3'	Tamaño amplicón
GaHV-2 <i>Meq Gen</i> rtPCR (204)(205)	Meq Forward	GGT CTG GTG GTT TCC AGG TGA	73 pb
	Meq Reverse	GCA TAG ACG ATG TGC TGC TGA	
	Meq sonda	AGA CCC TGA TGA TCC GCA TTG CGA CT (5'FAM, 3'BHQ1)	
GaHV-3 <i>DNA pol gene</i> rtPCR	MDV-2 Forward	AGC ATG CGG GAA GAA AAG AG	100 pb
	MDV-2 Reverse	GAA AGG TTT TCC GCT CCC ATA	
	MDV-2 sonda	CGC CCG TAA TGC ACC CGT GAC T	
MeHV-1 <i>sORF1 gene</i> rtPCR	HVT Forward	GGC AGA CAC CGC GTT GTA T	77 pb
	HVT Reverse	TGT CCA CGC TCG AGA CTA TCC	
	HVT sonda	AAC CCG GGC TTG TGG ACG TCT TTC	
<i>Chicken ovotransferrin Gene</i> Control endógeno para la rtPCR (203)	OT Forward	CAC TGC CAC TGG GCT CTG T	71 pb
	OT Reverse	GCA ATG GCA ATA AAC CTC CAA	
	OT sonda	AGT CTG GAG AAG TCT GTG CAG CCT CCA (5'Yakima Yellow, 3'TAMRA)	
H3 y H8 Reference Gen	H3 Forward	AACAACACCGATTTAGCCAGC	360 pb
Chicken	H8 Reverse	TGGTGAATCCACAATATCTACGAC	
132 bp Repeats(156)	MD-132 For	TACTTCCTATATAGATTGAGACGT GAGATCCTCGTAAGGTGTAATATA	434-bp y 566-bp Cepas (Rispen) atenuadas bandas más grandes.
	MD-132 Rev:		

Primers y Sondas de SIGMA. Sonda YY- TAMRA de Eurogentec.

d. Condiciones rtPCR

La rtPCR se llevó a cabo en platos de 96 pozos (Optical FAST 96-well PCR plates Applied Biosystems # 4346906) con un volumen final por pozo de 25 μL , la reacción contenía: Master Mix a 1X (Absolute Blue rtPCR low ROX mix, Fisher, # AB4318), MgCl_2 (1.0 mM), dATP, dCTP, dGTP and dUTP (cada uno a 0.2 mM), Taq DNA polimerasa (0.65 U) y Uracil *N*-glycosylase (0.25 U); Primer Forward virus 0,4 μM , Primer Reverse virus 0,4 μM , Primer Forward Gen OT³⁸ 0,4 μM , Primer Reverse Gen OT 0,4 μM , sonda virus 0,2 μM , sonda OT 0,2 μM (5-carboxyfluorescein (FAM)-fluorescent-tagged probe from Sigma-Genosys Ltd. and (VIC)-fluorescent Applied Biosystems), BSA³⁹ 10 μg y 4 μL de DNA (10 ng/ μL). Se utilizó el equipo ABI PRISM[®] 7500 (Applied Biosystems) para amplificar y detectar los productos de la reacción, utilizando las siguientes condiciones: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C (15 segundos) y 60 °C (1 min) (120). En el plato de 96 pozos se distribuyeron las muestras y controles de la siguiente forma: La primera columna se usó para los estándares del virus y la segunda para estándares del OVO gen. A partir de la columna 3 se pusieron las muestras a analizar.

e. Análisis

Los datos se analizaron con Microsoft Excel siguiendo las indicaciones de Baigent y colaboradores (120): se realizó el cálculo del valor 40-ct para el estándar del virus y del gen ovo⁴⁰. Con estos valores se graficaron las curvas y se halló el valor de la pendiente. El factor de diferenciación de ovo se calculó a partir de la curva estándar. Se normalizaron los datos para obtener el valor 40-ct de 10^4 células (40-ct virus + ((ovo 10- ovo ct-40) x mlog)). El dato normalizado se convirtió en número de copias de MDV genoma usando la

³⁸ Gen ovotransferrina.

³⁹ Bovine serum albumin: secuestra contaminantes de la PCR: BSA (Sigma # A7030) a 1,6 mg/mL.

⁴⁰ Se conoce el número exacto de copias de este gen en las células diploides de la gallina:

curva estándar (Normalized virus – virus plot / virus plot log). Una vez se obtuvo el promedio por edad, se realizó el logaritmo en base 10 para calcular el número de copias real por 10.000 células (resultados expresados en 10^4). Los resultados se expresan por cada 10.000 células (en lugar de cada 1.000.000 de células) debido a una modificación en el análisis realizada por el laboratorio de referencia (Pirbright Institute).

4.2.8 Aislamiento de MDV.

a. Preparación del inóculo.

Para el aislamiento viral se empleó el bazo, el cual estaba conservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. El órgano se cortó finamente con una cuchilla, y se añadieron 5 mL de DMEM con antibiótico al 2%. Una parte de este órgano se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para extracción de DNA, el resto se maceró y se pasó por un colador de células de $40\text{ }\mu\text{m}$ usando una jeringa y poniendo el contenido en un tubo falcón de 50 mL. Se centrifugó la suspensión de células a 450 g por 5 minutos para formar un pellet de células. Estas se resuspendieron en 3 mL de DMEM y se añadieron suavemente a un tubo Falcon de 15 mL en el que se tenían 3 mL de ficol (*Ficoll Paque Premium, GE health care*), formando una capa. Se centrifugó a 800 g por 30 minutos a temperatura ambiente, usando aceleración y frenado lento. Los linfocitos se tomaron de la interface con una pipeta y se pusieron en medio. Se centrifugaron a 450 g por 5 minutos y se resuspendieron en 1mL de DMEM. Se realizó conteo de los linfocitos. La dosis de infección fue de 6×10^6 de cel/pozo, 3×10^6 de cel/pozo y 1×10^6 de cel/pozo. Estos linfocitos se inocularon en cultivos primarios de Fibroblasto de Embrión de Pollo (FEP), los cuales tenían una confluencia del 80%.

b. Inoculación en cultivo primario

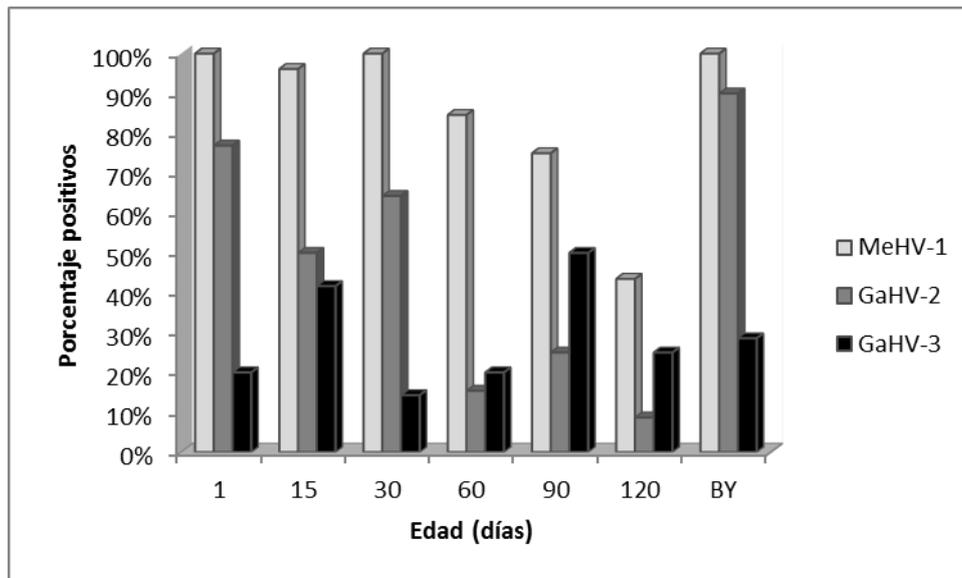
Los platos de 12 pozos con 80% de confluencia de células de fibroblasto de embrión de pollo se lavaron 3 veces con PBS (Phosphate buffered saline) 1X. Se inocularon las dosis ya descritas, dejando 1 pozo como control negativo (0,5 ml de DMEM). Después de 20 minutos de adsorción, se añadieron 2 mL de medio de mantenimiento (DMEM suplementado con SFB 5% y AA 2%) en cada pozo. Las células inoculadas se dejaron en la incubadora a 37 °C. Diariamente se observaron en microscopio de luz invertida (Olympus CKX31) para detectar posibles efectos citopáticos (ECPs). Una vez se observaron cambios con respecto al control, para confirmar la presencia del virus, se procedió a realizar cosecha de las células y posterior extracción de DNA. Con éste se realizó PCR para serotipo 1 y 3.

4.3 Resultados

Teniendo en cuenta que el objetivo del estudio buscaba evaluar la dinámica del virus en las aves, los resultados que se presentan a continuación corresponden al análisis completo de todas las granjas por grupo etéreo.

4.3.1 El MDV circula en sangre durante todo el levante.

Por PCR estándar, MeHV-1 se evidencia estable durante los primeros 30 días, en los cuales la positividad es del 100% (días 1 y 30), y del 96% para el día 15. A los 60 días desciende a 85% y termina en 15 % a los 120 días. Para GaHV-2 se tiene un comportamiento similar aunque con una frecuencia menor que para MeHV-1. También se encuentra que la dinámica para las edades presenta algunos picos con tendencia a la baja a medida que aumenta la edad. Para GaHV-3 se determinó una positividad por debajo del 50% en todas las edades (ver gráfica 3).



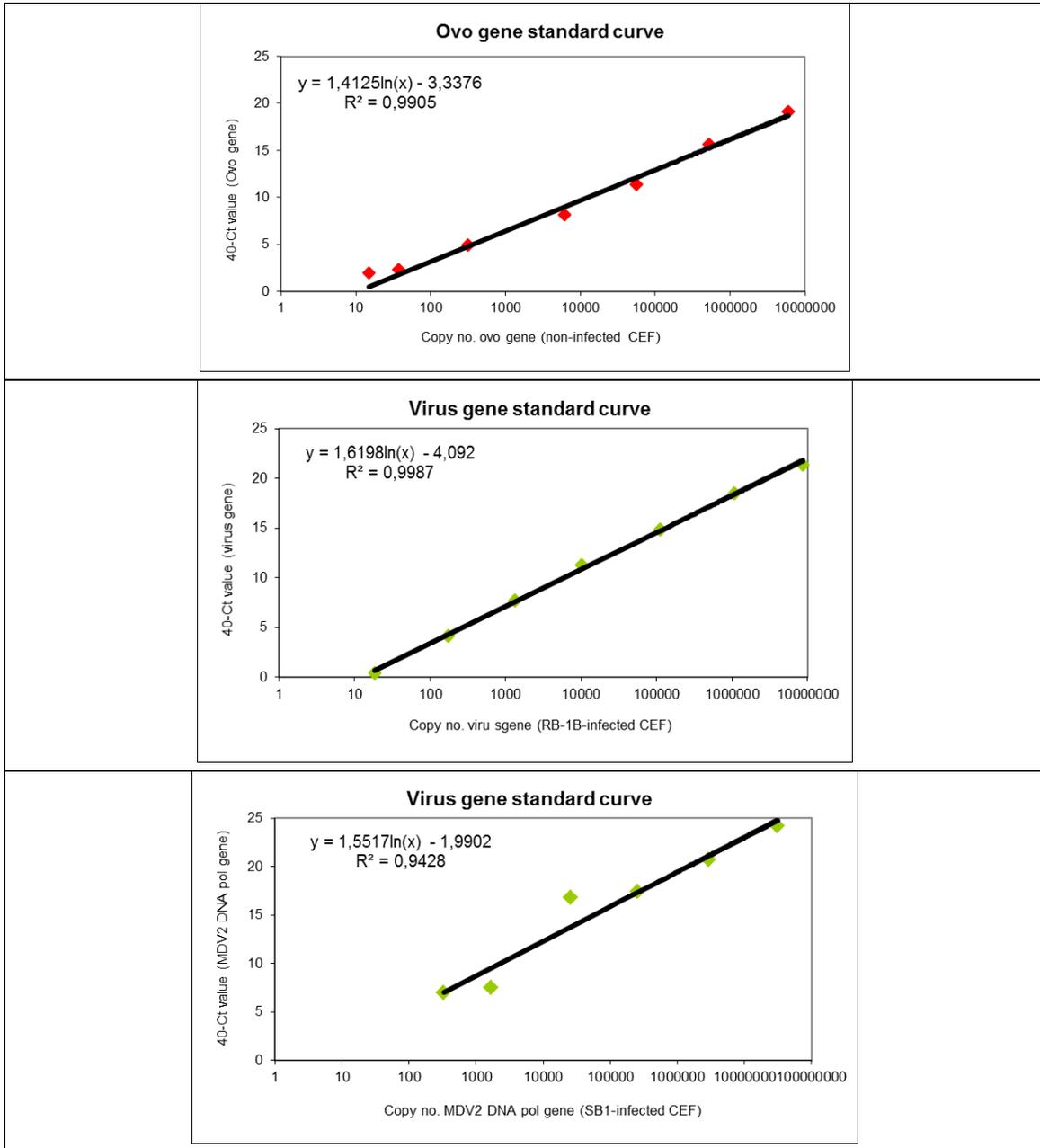
Gráfica 3: Resultados por PCR para MDV MeHV-1 (serotipo 3), GaHV-2 (Serotipo 1) y GaHV-3 (serotipo 2) en sangre en las diferentes edades.

La positividad para los tres serotipos fue diferente en todas las edades, siendo mayor para MeHV-1. En aves sin vacunar se encontró 100% de positividad para MeHV-1, 90% para GaHV-2 y 29% para GaHV-3.

Tabla 7: Promedio de cuantificación del MDV en sangre (expresado en Número de copias del genoma viral por cada 10.000 células)

Edad	GaHV-2	MeHV-1
1	13,03564	75,37964
15	83,48471	53,64669
30	89,64499	34,8987
60	153,9335	26,38574
90	89,27613	30,24934
120	269,8948	19,60412
TP	966,6515	16,8079

Serotipo 1= Punto de corte para reacción del gen viral= 0,2; eficiencia= 3,73; Punto de corte para reacción de referencia= 0,2; eficiencia: 3,25; limite 18,6 copias. **Serotipo 3**= Punto de corte para reacción del gen viral= 0,2; eficiencia= 3,80; Punto de corte para reacción de referencia= 0,2; eficiencia: 3,2; limite 4.



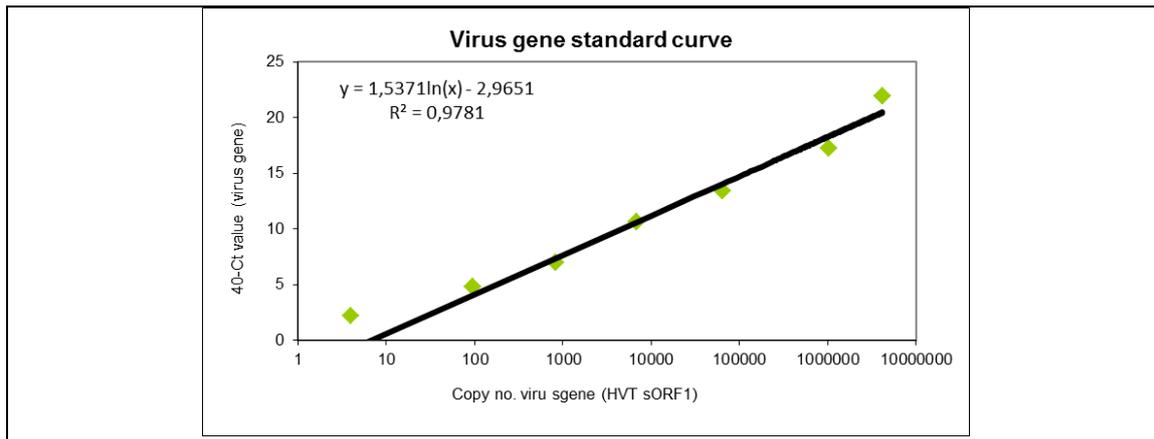
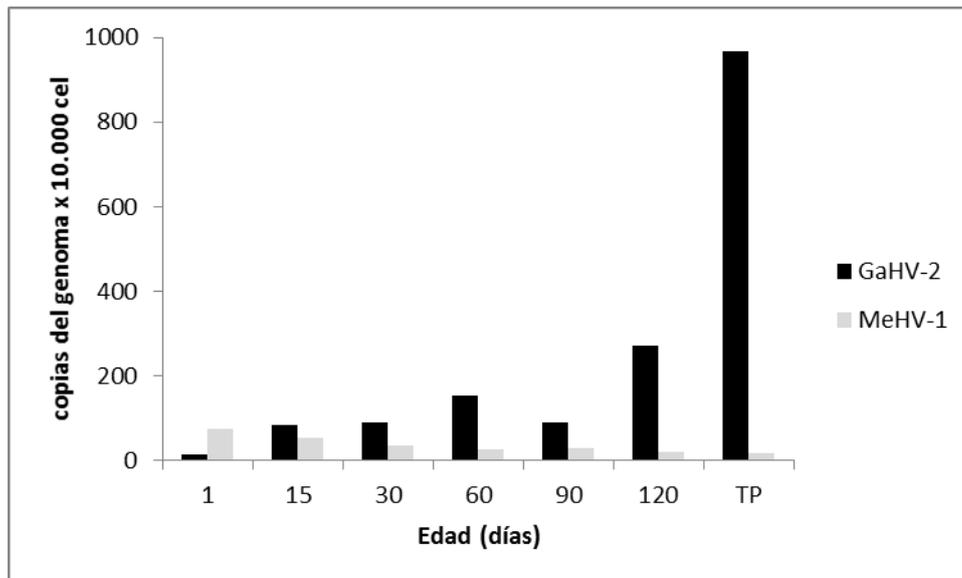


Tabla 8. Panel de Gráficas con la Curva estándar de la q PCR de GaHV-2 (MDV1 *Meq* gene), GaHV-3 (MDV2 SB1), MeHV-1 (HVT sORF 1) y Ovo gene. La línea sólida, obtenida por análisis de regresión lineal, indica la media de 40 - Ct valores de la rtPCR de las diluciones del gen control, y las líneas de puntos indican la 95 % límites de confianza para la regresión.

El 95% de las muestras de sangre evaluadas (Tabla 7) resultaron positivas para el gen *Meq* por rtPCR en diversas cantidades. Se observa presencia del virus a partir del día 1 de edad, con un pico en los niveles del genoma viral a los 60 días. La curva estándar para cada serotipo y el gen de referencia se muestran en la Tabla 8. Los límites de la real-time rtPCR para GaHV-2, GaHV-3 y MeHV-1 fueron 18,6, 9,4 y 4 copias del genoma respectivamente. Para el gen de referencia se tiene un límite de 14,8 copias. Los datos se convirtieron en número de copias de genoma por cada 10.000 células y se encontró que la muestra con menor número de copias detectada fue de 0,3 copias y la de mayor número fue 45.953,06 copias por cada 10.000 células.

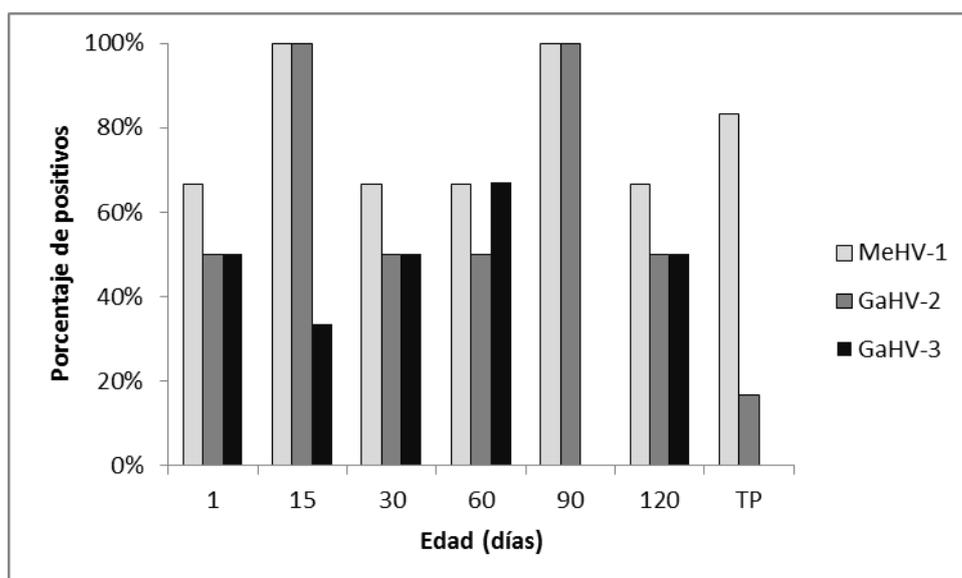
En la tabla 9 se observa que el GaHV-2 se encuentra en bajas cantidades el día uno, pero aumenta sus valores para el día 15 y 30, alcanzando pico a los 60 días y un máximo valor a los 120 días. Por otro lado, para MeHV-1 presenta altos valores en sangre al día 1 que van disminuyendo con la edad. GaHV-3 se encuentra con valores por debajo de cero en todas las edades.



Gráfica 4: Resultados de rPCR para GaHV-2 (*Meq Gen*) y MeHV-1 en muestras de sangre, expresado en número de copias del genoma viral por cada 10.000 células del ave.

En sangre el 72,6% resultaron positivas para GaHV-3, con un mínimo de 0,04 copias y un máximo de 121.8. Este serotipo no se aplica en la vacuna, por lo tanto la presencia de genoma viral se debe a una infección de campo. Hasta el momento no se considera patogénico para las gallinas (24).

4.3.2 El MDV es eliminado en pluma en mayor cantidad a los 30 días.



Gráfica 5: Resultados por PCR para MDV MeHV-1 (serotipo 3), GaHV-2 (Serotipo 1) y GaHV-3 (serotipo 2) en *poles* pluma en las diferentes edades.

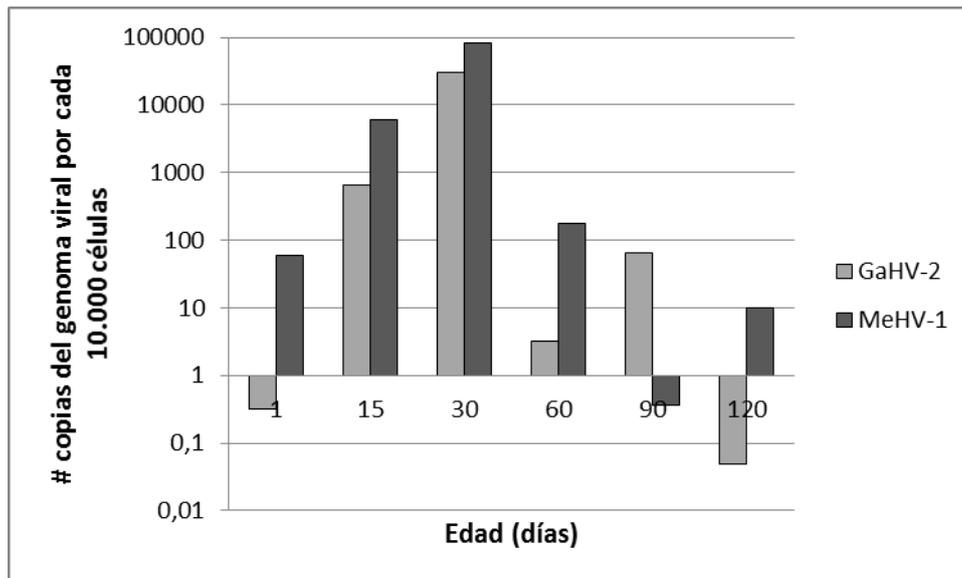
En los *poles* por edad de pluma se evidencia positividad desde el día uno para los tres serotipos, con presencia en 100% de las aves en edades de 15 días y 90 días, sugiriendo que hay una segunda fase de infección productiva de las aves posterior a los 60 días, que puede ser debido a la latencia del virus vacunal, o a una nueva infección con virus de campo (gráfica 6).

Tabla 9: Cuantificación del MDV en *pool* de pluma (expresado en número de copias del genoma viral por cada 10.000 células)

Número de copias de genoma viral en pluma			
Edad	GaHv-2	gaHV-3	MeHV-1
1	0,312313429	0,332307124	60,71609303
15	645,1540853	1,24224E-07	5982,611818
30	30297,88834	166,9318104	82033,30975
60	3,230308373	5,08733E-10	176,5740995
90	65,05419278	0	0,363384538
120	0,049720974	9,2804E-09	10,014501
TP ⁴¹	0	0,332307124	0

Para los *poles* de pluma, se evidencia para los tres serotipos un pico de excreción a los 30 días, siendo el de serotipo 3 el de mayor número de partículas excretadas al ambiente.

⁴¹ Aves de Traspatio (mayor a 3 meses de edad)

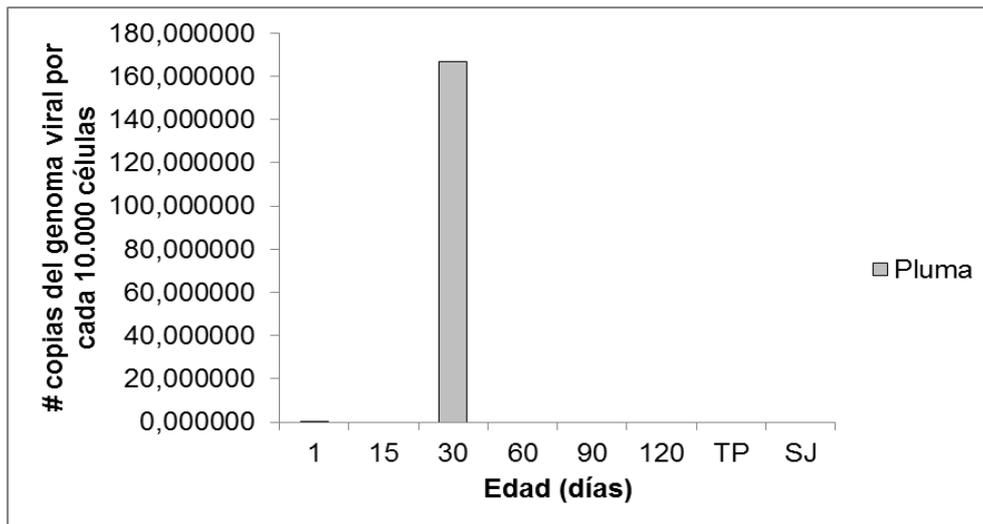


Gráfica 6: Resultados de rtPCR para GaHV-2 (*Meq* Gen) y MeHV-1 en muestras de pluma, expresado en número de copias del genoma viral por cada 10.000 células del ave

El 100% de los *pool* de pluma (gráfica 7) evaluadas resultaron positivas para el gen *Meq* por rtPCR. La muestra con menor número de copias detectada fue de 3,1 copias, y la de mayor número fue 1.325.936,38 copias.

Las aves de traspatio resultaron positivas con más de 35 mil copias de genoma en pluma, demostrando que estaban eliminando virus en el momento del muestreo. Estas aves están alojadas en patios y solares de los alrededores de granjas comerciales, representando un factor de riesgo desde el punto de vista de la bioseguridad.

Para GaHV-3, en pluma (gráfica 8) se encontraron 84,6% de muestras positivas, con un mínimo de 0,03 y un máximo de 24.550 copias. Las muestras de 90 y 120 días fueron negativas.



Gráfica 7: Resultados de rtPCR para GaHV-3 (*DNA pol* gen) en muestras de *pool* de pluma, expresado en número de copias del genoma viral por cada 10.000 células del ave.

En los *pool* de pluma se encontró genoma del GaHV-3 al día 1 (0,33) y día 30 (166,9), mientras que en sangre los niveles en todas las edades están por debajo de cero copias. Sin embargo, estos hallazgos son indicativos de infección de campo debido a que en estas granjas no se ha usado vacuna de GaHV-3. El 100% de las muestras de pluma fueron positivas para MeHV-1, con un mínimo de 0,9 copias y un máximo de 963.230 copias. Se observa un incremento significativo en los niveles de MeHV-1, al día 30, sugiriendo una reinfección días antes, similar al GaHV-2.

4.3.3. El número de bandas en la PCR del segmento BAMH sugiere que en las granjas circulan varias cepas.

La electroforesis muestra bandas a nivel de 1000 y 1134 pb, demostrando que el genoma tiene cerca de 8 bandas en total (8 repeticiones) de este fragmento, por lo que se puede decir que son cepas muy atenuadas (Imagen 2 y 3). En caso de ser una cepa muy virulenta debería presentar solo 1 o 2 repeticiones de un tamaño de 434 pb.

MW C+ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

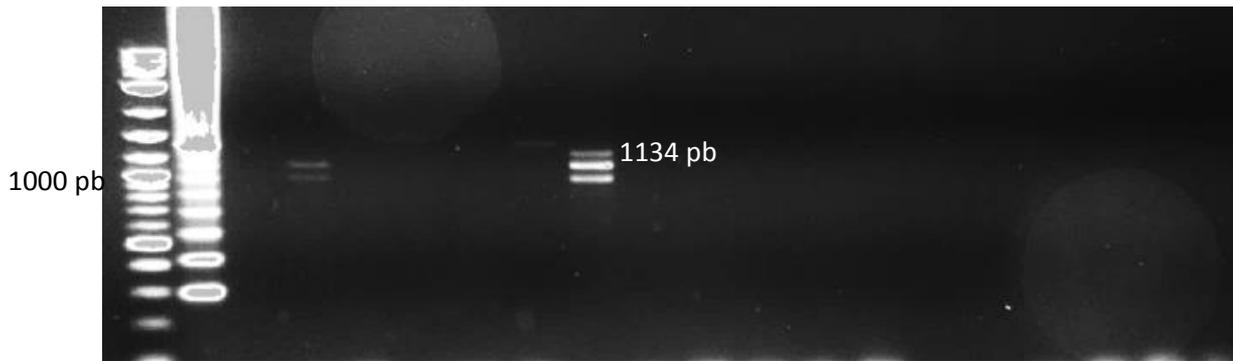


Imagen 2: Productos de amplificación de la PCR 132 pb. Control positivo cepa *Rispens* (8 repeticiones). Gel Agarosa 1%. Eje horizontal: MW: Marcado de peso molecular. C+: Control positivo. 1-18: Algunas Muestras.

MW 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

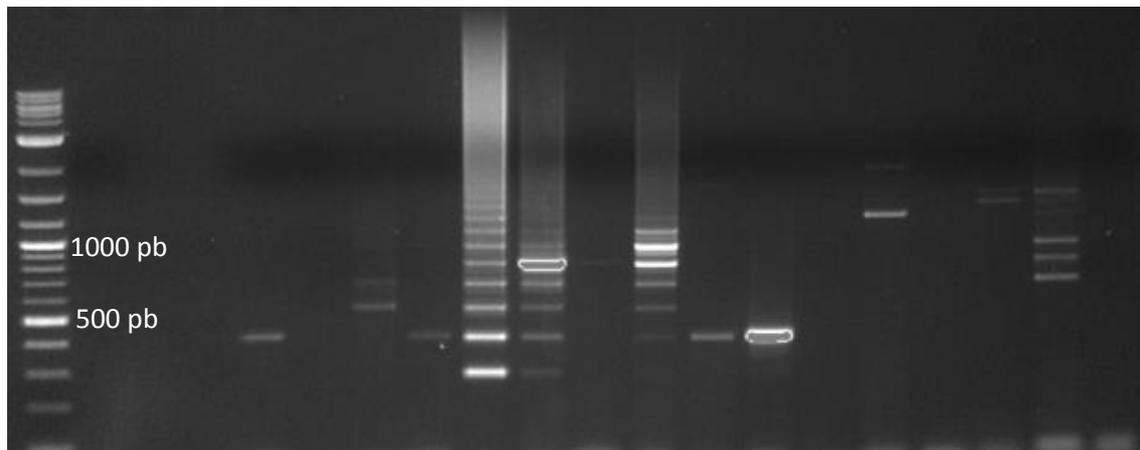


Imagen 3: Gel Agarosa 1%. Productos de amplificación de la PCR 132 pb. Control positivo cepa *Rispens* (8 repeticiones). Muestras de sangre (individual) y pluma (pool por edades). Eje horizontal: MW: Marcado de peso molecular. 1-19: Muestras. 1 (1 día), 2 (1 día), 3 (1 día), 4 (120 días), 5 (1 día), 6 (1 día), 7 (15 días), 8 (30 días), 9 (60 días), 10 (120 días), 11 (120 días), 12 (120 días), 13 (1 día), 14 (15 días), 15 (30 días), 16 (60 días), 17 (90 días), 18 (120 días), 19 (Negativo). Se observan muestras con diferentes números de bandas indicando diferencias en sus secuencias.

En la primera y segunda edad se observa 1 banda, la cual es reemplazada por 8 bandas a partir de los 30 días. Esa diferencia en los patrones sugiere que hay más de una cepa de serotipo 1 (GaHV-2) circulando en las granjas, una atenuada y otra con características de virulencia.

4.3.4 Mutaciones en el gen *Meq* sugieren que se tratan de cepas atenuadas de GaHV-2

Se secuenciaron bandas obtenidas de aves de 15 y 30 días de edad, las cuales presentaban alta concentración de genoma viral y se observaba una banda mucho más gruesa en la electroforesis del gen *Meq*, lo que permitió su corte y purificación. Las secuencias de aminoácidos deducidas fueron alineadas con cepas de alta y baja virulencia aisladas en diferentes regiones geográficas y algunas cepas vacunales (Tabla 10). Se encontró que las cepas presentan cambios en aminoácidos puntales asociadas a cepas vacunales (174). Al realizar una búsqueda preliminar en BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) se encontró que las cepas poseen un 99% de identidad con cepas americanas de campo y vacunales (Tabla 9) (26).

Tabla 10: Cepas con porcentaje de identidad para las muestras secuenciadas.

Código de granja y nombre de secuencia.	Cepa, año de aislamiento y Número de acceso GenBank (% identidad)
D2P (UDEACO 02/14)	RB1B, 2010, HM488349 (99%)
D2P (UDEACO 02/14)	RB1B, 2010, HM488349 (99%)
DUST (UDEACO 03/14)	CU-2, 2007, EU499381 (100%) 3004, 2007, EU032468 (99%)
M3P (UDEACO 08/14)	RB1B, 2010, HM488349 (99%)

Al verificar la posición de los aminoácidos en los sitios que han sido reconocidos como puntos clave en la virulencia de los virus, se encuentra que

no posee estos cambios, y que por el contrario, tiene los mismos aminoácidos que cepas atenuadas (Ver tabla 10).

Al realizar el árbol filogenético, se encontró que las cepas encontradas en este estudio tienden a agruparse con las cepas vacunales y cepas estadounidenses virulentas (Ilustración 5).

Tabla 11: Alineación de secuencia de aminoácidos deducidos de la proteína Meq.

Cepa	Tipo	Código	71	77	80	93	115	119	153	176	180	217/276	233	258	277/336	283/342	320/379
cu-2	mMDV	AY362708	S	E	D	Q	V	C	P	P	T	P	P	L	L	A	I
567	vMDV	AY362709	A	E	Y	Q	V	R	P	P	T	A	P	L	L	A	I
627	vMDV	AY362713	A	E	Y	Q	V	R	P	P	T	A	P	L	L	A	I
bc-1	vMDV	AY362707	S	A	D	Q	A	C	P	P	T	P	P	L	L	A	I
JM	vMDV	AY243331	S	A	D	R	A	C	P	P	T	P	P	L	L	A	I
686	vv+MDV	AY362727	A	K	D	Q	V	R	Q	A	A	A	P	L	P	A	I
RL	vv+MDV	AY362720	A	K	D	Q	V	R	Q	A	A	A	P	L	L	A	I
TK	vv+MDV	AY362721	A	K	D	Q	V	R	Q	A	A	A	P	L	L	A	I
RB1B	vvMDV	AY243332	A	K	D	Q	V	C	P	P	T	P	P	L	L	A	I
<i>D2P</i>		UDEACO 02/14	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>D</i>	<i>Q</i>	<i>V</i>	<i>C</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>T</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>L</i>	<i>L</i>	<i>A</i>	<i>I</i>
<i>DUst</i>		UDEACO 03/14	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>D</i>	<i>Q</i>	<i>V</i>	<i>C</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>T</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>L</i>	<i>L</i>	<i>A</i>	<i>I</i>
<i>M3P</i>		UDEACO 08/14	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>D</i>	<i>Q</i>	<i>V</i>	<i>C</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>T</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>L</i>	<i>L</i>	<i>A</i>	<i>I</i>

Se muestran las posiciones de cambio de aminoácidos que están asociadas con virulencia. Proteína Meq, aminoácidos del 1 al 400. Las cepas del estudio muestran un patrón similar a las cepas vacunales mMDV.

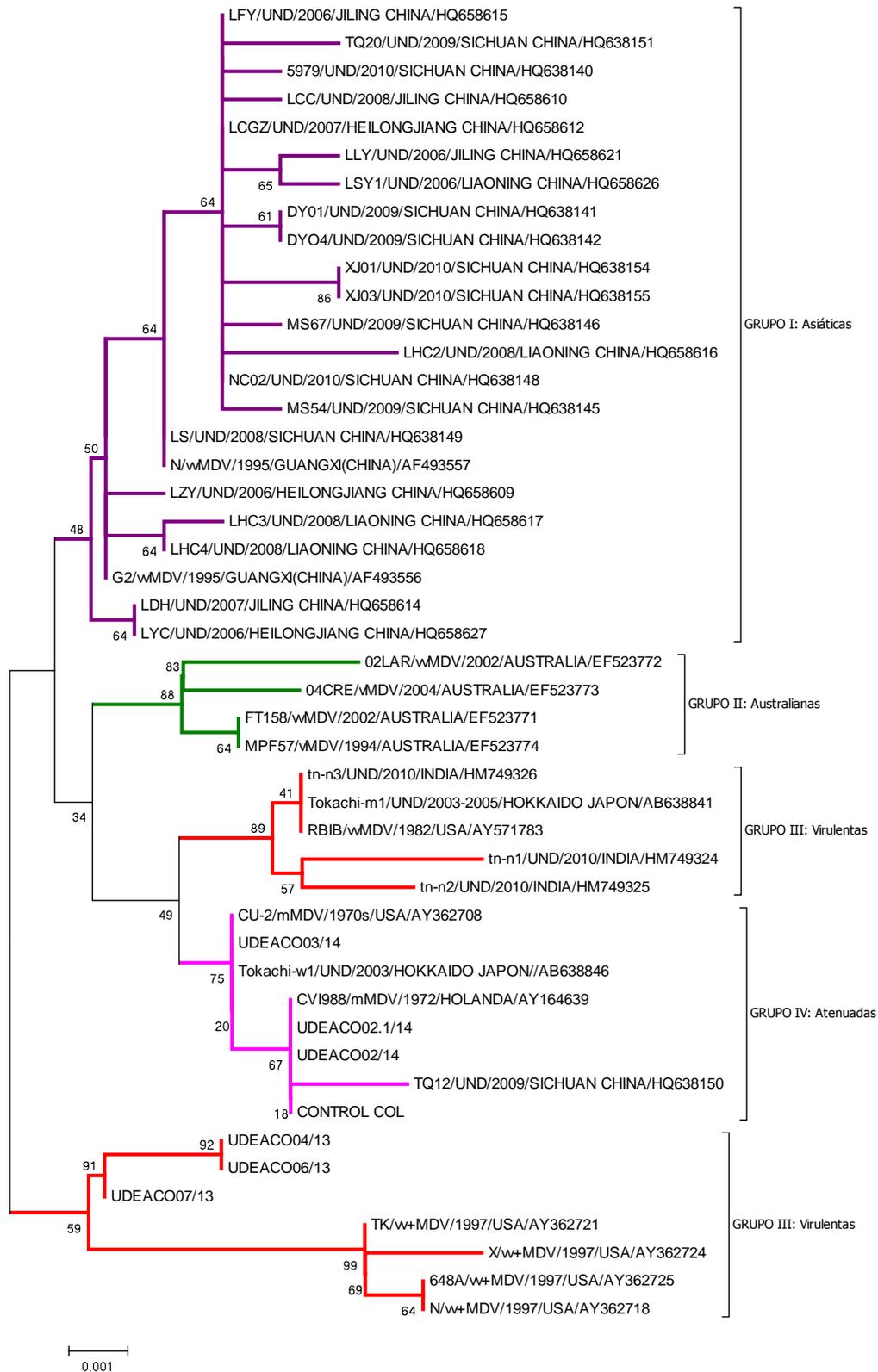
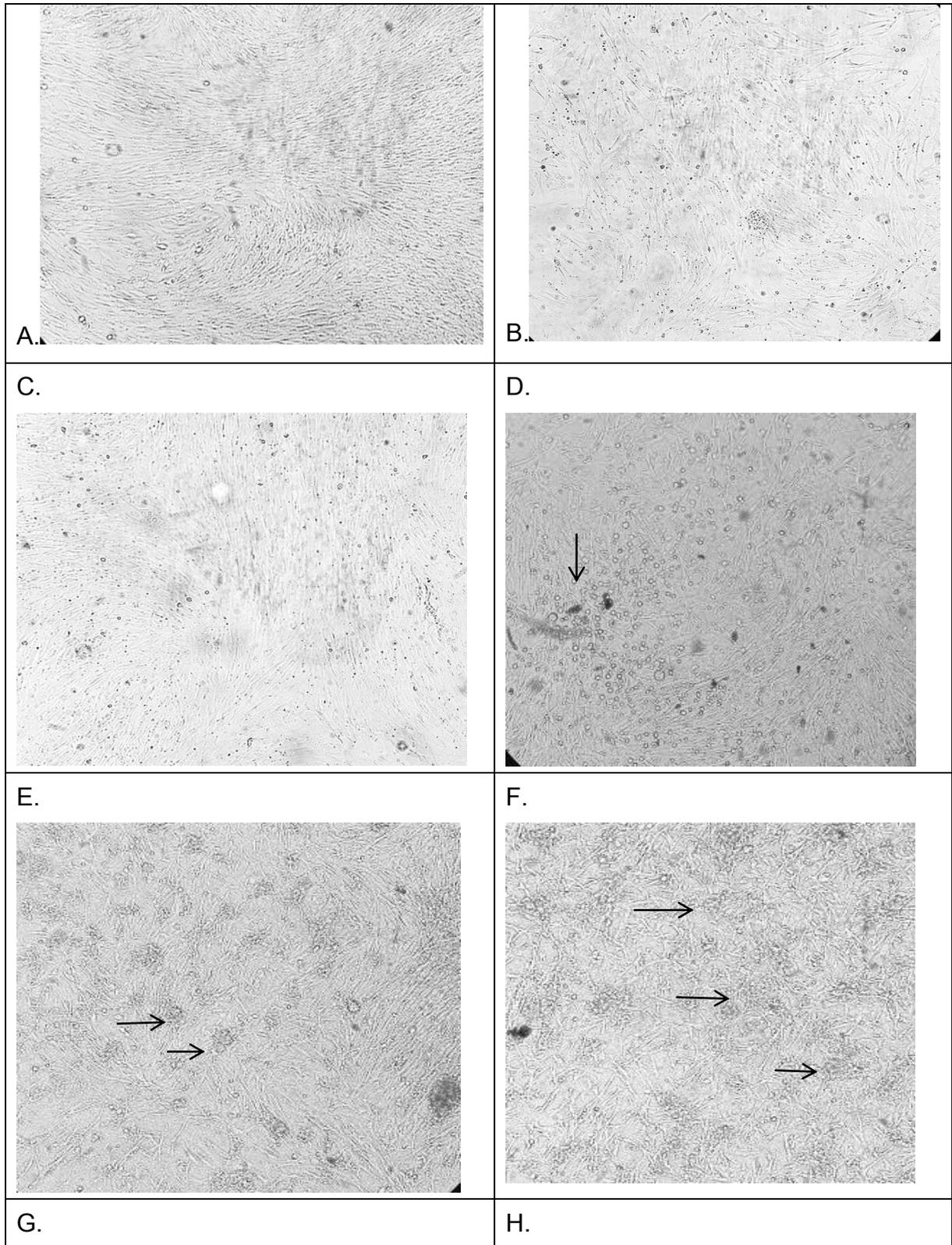
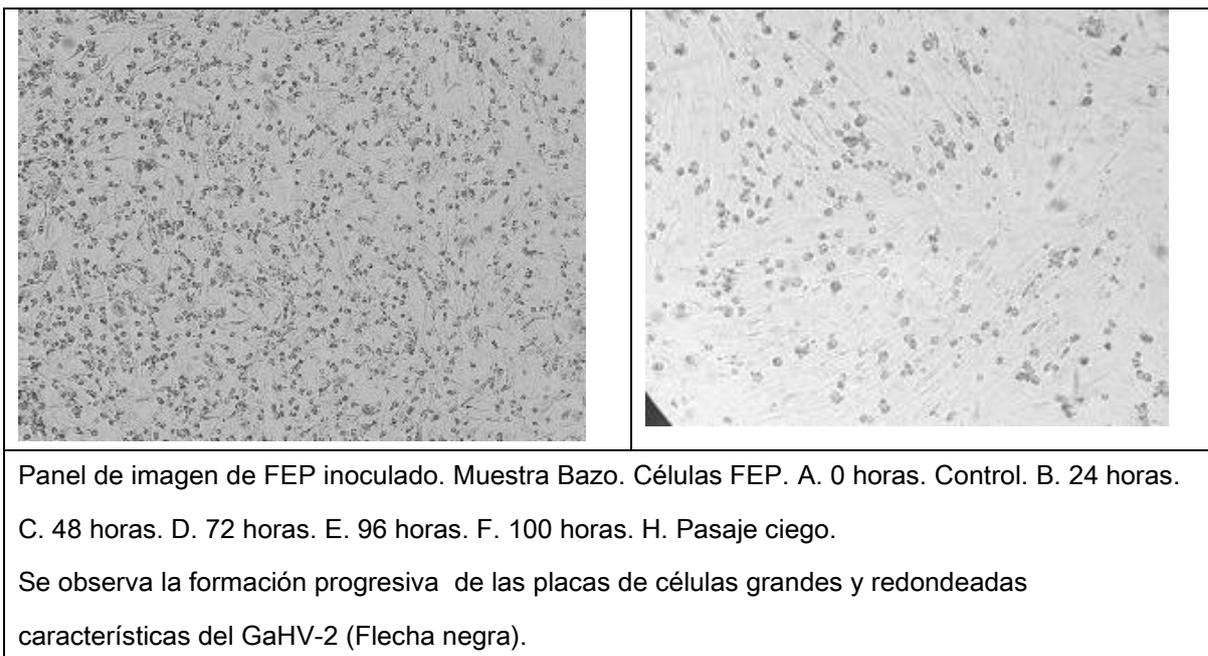


Ilustración 5. Árbol Filogenético para cepas MDV. Método de Neighbour-Joining. 1000 réplicas. Análisis por nucleótidos del Gen *Meq*. UDEACO= cepas Colombianas analizadas.

4.3.5 Efecto citopático en FEP compatible con GaHV-2

Tabla 12. Panel de Imágenes de FEP inoculadas con muestras de bazo.





A partir del tercer día se comenzó a ver efecto citopático como el descrito por Shat y Nair en 2013 (23,24), que se caracteriza por formar placas de células redondas y refráctiles, con algunas zonas de desprendimiento celular. Al quinto día las células se cosecharon y se les extrajo el DNA para la PCR, la cual resultó ser positivo para el gen *Meq*, confirmando así el aislamiento de *GaHV-2*.

4.4 Discusión

Las aves de este estudio que pertenecían a granja comercial fueron vacunadas al día 0 (en la incubadora) con *MeHV-1* (Vaxxitek⁴², Merial) y *GaHV-2* (vacuna *HVT+ Rispens*). Ambas vacunas se mezclan y se aplican a nivel cervical subcutáneo. La vacuna HVT (naturalmente avirulenta: cepa FC126) ha demostrado ser altamente efectiva previniendo la enfermedad de Marek, pero no la infección con los demás serotipos (125,206,207). Se reporta que esta vacuna tiene una excreción a largo término (208), lo que concuerda con el resultado que se obtuvo en este estudio, en el cual se encontró *MeHV-1* hasta

⁴² La cepa de la vacuna es un herpesvirus de pavo (HVT), que expresa el antígeno protector (VP2) del virus de la bursitis infecciosa aviar (IBDV) cepa Faragher 52/70. Cada dosis contiene el Virus vivo recombinante vHVT013-69, como mínimo 3,6 log₁₀ UPF.

el día 120 de edad. Por PCR convencional, todas las granjas muestreadas fueron positivas en sangre para serotipo 1 y 3, pero con relación inversamente proporcional a la edad, es decir, disminución de frecuencia de positivos a medida que aumenta la edad, hasta llegar a niveles por debajo del 50% a los 120 días.

La cuantificación absoluta del genoma viral puede ser determinada gracias a la preparación de curvas estándar (titulación de un control), o por co-amplificación competitiva con una cantidad conocida de DNA control (120). La rtPCR resultó ser más rápida, sensible y reproducible que la PCR estándar, además de que es un sistema cerrado que no requiere de manipulación del amplicon, con lo que se reduce el riesgo de contaminación (209,210). Se sabe que una copia del genoma del MDV es equivalente a dos copias del gen *Meq*, ya que este está presente en las regiones repetitivas IRL y TRL. Para determinar el número de copias del genoma viral por células, se utiliza un método modificado al usado en *Herpesvirus* humanos, el cual usa el gen β -actina para determinar el número de copias del virus por cada 100.000 células neuronales (211). En este caso se utiliza el gen *ovo* de la gallina, el cual es un *house-keeping gene* presente en cada una de las células de gallina y por lo que permite normalizar cada muestra con el número de copias de DNA viral por 2×10^6 copias del gen, ósea 10^4 células (120). Además, permite confirmar la presencia de todos los reactivos de la PCR, DNA amplificable y ausencia de inhibidores de la PCR (120). Sin embargo, en muestras de órganos (incluyendo la sangre) se encuentran abundantes células que no son el blanco específico del MDV, por lo que el cálculo del genoma obtenido puede estar diluido. Se ha demostrado que menos del 2% de los linfocitos del bazo expresan antígenos de MDV, o sea que si se tienen 10.000 copias de genoma por cada 100.000 de células, el 2% de células que tiene el virus tendrían 2 copias del genoma (212).

Sin embargo, la carga viral en la pluma es un buen indicador de la carga de MDV en los órganos linfoides (153), por lo que la medición de la carga viral, periódicamente en las aves de levante, puede ser un sistema de monitoreo de la vacunación; además sirve para determinar el tiempo en que la carga es máxima, el tiempo óptimo de re vacunación, e inclusive evaluar la cantidad de virus que está siendo liberada en el ambiente. El valor diagnóstico de la detección del genoma del MDV en el epitelio de la pluma de aves comerciales ha sido comprobado anteriormente (63,160). El epitelio del folículo de la pluma es el sitio en el cual se produce el MDV libre de células y es expulsado al medio ambiente (148), allí puede ser encontrado después de 10 dpi. En aves menores de 10 días, el muestreo de pluma se hace difícil ya que en ellas está presente el plumón, el cual tiene una pulpa pequeña a partir de la cual no se logra obtener cantidades suficientes de DNA. Se ha determinado que las mejores edades para muestreo en pluma son entre 2 y 5 semanas (15 y 35 días de edad) ya que se logra buena concentración de DNA (180- 210 µg) (120). En aves mayores el DNA es poco y la contaminación con melanina aumenta.

De acuerdo a lo visto en los resultados en pluma, se sugiere una infección productiva de *GaHV-2* que está siendo expulsado por folículo plumoso en todas las edades, con niveles elevados a los 15 y 30 días. Se ha visto que 14 dpi ⁴³se encuentran niveles de *GaHV-2* de 100 copias en sangre, mientras que en pluma los niveles son mucho mayores (12.000) (120) (213), lo que concuerda con lo encontrado en este estudio, en el cual observamos niveles de más de 60.000 copias a los 15 días en pluma, y menos de 100 copias en sangre. Las cepas vacunales como *CV1988* muestran un comportamiento similar en pluma, con valores de más de 1000 copias después de 11 dpi (190), y en aves retadas con cepa *RB1B* sin vacunar se observan valores de más de 100.000 copias.

⁴³ Días pos infección

El DNA de los tres serotipos del MDV puede ser encontrado en pluma a partir de 5 o 7 días después de la infección. No se sabe si este DNA representa virus infectante libre de células, o solo DNA en la pluma, ya que los linfocitos periféricos en sangre MDV positivos se encuentran en la pulpa de la pluma a los 4 días pi, lo que coincide con el aumento de la transcripción de INF- γ (58). La cinética de replicación y excreción viral difiere entre la cepa vacunal y la de campo. Al día 1 de edad, se encontró genoma del *GaHV-2* en baja concentración (1,4 copias) en sangre, con un aumento al día 15, 30 y 60. A los 90 días disminuye, pero vuelve a subir alcanzando un pico a los 120 días. Este comportamiento concuerda con el ciclo de replicación del virus de campo, el cual presenta declinación lenta (151). Se ha encontrado que la cepa vacunal muestra un pico en sangre a los 7 (199) o 14 días (120), con una caída lenta en los días posteriores, mientras que la cepa de campo continua incrementando hasta los 35 días post infección (199). En este estudio se encontró que la positividad del *MeHV-1* presenta un pico a los 30 días en pluma y luego desciende.

La infección solo con *GaHV-2* ha mostrado que la replicación viral se da principalmente en los primeros días post infección, tanto en sangre como en pluma (151), con larga duración en linfocitos, polvo y pluma, y que es eficazmente transmitida a aves sin vacunación (208). Al contrario de lo que encontró Baigent *et al.* 2005 (120) en aves SPF en condiciones controladas, las cuales presentaban un pico de positividad a los 14 días y luego descendían lentamente, en esta investigación se encontró un pico para *GaHV-2* a los 15 y a los 90 días.

La coinfección con la vacuna y el virus de campo puede llevar a la evolución de las cepas y generar una enfermedad más severa en el ave (214), este mecanismo es el que se sospecha sea el causal de la evolución del MDV (67,184). Esta interacción puede afectar la cinética del virus, disminuir la carga

viral del MDV patogénico y su replicación en linfocitos (190) y pluma lo que concuerda con lo encontrado en este estudio con respecto a los serotipos vacunales (GaHV-2 y MeHV-1) y el serotipo de campo (GaHV-3).

También se ha visto que retar a las aves con GaHV-2, 5 días después de la vacunación aumenta la excreción del virus en la caspa en relación con las no retadas (208). Sin embargo Haq *et al.* (215), no encuentran esta diferencia. Islam *et al.* 2014 encontraron que la confección del virus vacunal con el virus de campo conlleva a una competencia y por tanto supresión de la replicación de uno de los dos virus, más marcado en sangre que en pluma. El comportamiento que se encontró durante el levante sugiere que hay infección de campo que genera que los niveles de virus tanto en sangre como en pluma presenten unos picos anormales en diferentes puntos.

Por otro lado, en la PCR de 132 pb, la banda monómera presenta más luminosidad que las demás bandas, por lo tanto se aprecia mejor (216). Se ha reportado que el GaHV-2 posee tres bandas repetidas de 132 pb en el fragmento L terminal e interno. Otros autores encuentran 2 bandas en el fragmento (200). Kanamori *et al.* (1986) reportó la presencia de 2 o 3 bandas en el *GaHV-2* oncogénico, sin embargo se ha reportado que la oncogenicidad del virus está relacionada con la cantidad de repeticiones de 132 pb que presente, ya que este segmento da lugar a una familia de mRNA que codifica proteínas como la pp38 y el fragmento BamHI-H DNA, las cuales están asociadas con el estado de transformación de las células. La amplificación de repeticiones de 132 pb en GaHV-2 no patogénicos puede indicar el cambio en la expresión del gen pp38 o genes adicionales. Se ha reportado que los fragmentos de secuencias de nucleótidos en BamHI-D y BamHI-H del genoma viral se alteran luego de pasajes *in vitro* del vvMDV-1 sugiriendo que estos cambios genómicos están asociados con la atenuación del virus (oncogénico). Ya que se encontró un patrón de bandas diferente, cerca de 8 bandas en

algunas de las muestras (compatibles con cepas atenuadas), mientras que en otras solo una o dos, se sugiere que hay infección con más de una cepa con diferente grado de atenuación, una de ellas pudiendo ser del tipo vMDV, ya que solo tiene dos repeticiones de 132 pb.

De acuerdo a la secuencia de aminoácidos de la proteína *Meq*, y la agrupación en el análisis filogenético se puede decir que las cepas encontradas en las muestras son de tipo atenuadas y que tienen alto porcentaje de identidad con cepas del mismo continente. Se ha visto que las cepas de distintos aislamientos tienden a agruparse por regiones geográficas, mostrando un patrón por localización (38,216–219).

4.4 Conclusiones.

Los tres serotipos del MDV están circulando durante todo el levante con diferentes niveles tanto en sangre como en pluma, que sugieren que las aves están siendo retadas con virus de campo y que puede haber coinfección con otras cepas, de carácter atenuado y virulento. Las aves de traspatio presentan también infección con los tres serotipos lo que supone un riesgo para las aves comerciales y pueden servir como fuente de infección de virus más virulento que más adelante puede generar brotes en las granjas de postura.

Es necesario llevar a cabo un monitoreo del virus en los galpones en condiciones normales, para así determinar la dinámica de replicación y eliminación del MDV en el ambiente, y el comportamiento del virus vacunal, para así determinar el momento de infección con virus de campo.

Capítulo 5: Presencia del virus de la anemia infecciosa aviar determinada mediante PCR en aves de postura de algunas granjas del norte y oriente del departamento de Antioquia.

5.1 Introducción

Como consecuencia directa de la inmunodepresión, el CIAV es uno de los agentes que genera importantes pérdidas económicas en la industria avícola (47). En condiciones de campo, este virus genera problemas más graves cuando está asociado a otros agentes como IBDV⁴⁴ (32), Adenovirus, Reovirus (16,33,34) y MDV.

Por los signos que se pueden desarrollar, la enfermedad clínica se conoce como síndrome de dermatitis y anemia, enfermedad del ala azul, anemia infecciosa o síndrome hemorrágico (220). La morbilidad y mortalidad ha sido reportada de hasta 60% pero lo más común es que ocurra solo entre 5 y 15%. La serología demuestra que hay alta prevalencia del virus a nivel mundial con diferencias antigénicas encontradas en las pruebas de neutralización viral con anticuerpos monoclonales (44); Sin embargo, los aislamientos han demostrado poca variabilidad a nivel del genoma.

Cuando se da una infección con CIAV en aves menores de 2 semanas sin anticuerpos maternos, se genera daño severo en órganos linfoides primarios y secundarios, provocando así atrofia linfoide generalizada, anemia aplásica, lisis de linfocitos T inmaduros y baja producción de anticuerpos (7).

La forma clínica actualmente es rara debido a la vacunación de reproductoras, sin embargo la forma subclínica es común ya que los anticuerpos previenen los signos pero no la infección, transmisión o infecciones secundarias por la inmunosupresión (45). En Colombia no es obligatorio el uso de vacuna contra

⁴⁴ Virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio.

CIAV, (Resolución 811 de 1992 del ICA⁴⁵, derogada por la R.3651 de 2014), pero se encuentran vacunas disponibles en el mercado, tales como: NOBILIS AE46+POX47+CIAV48, Circomune® (Cepa del Ros) y Avipro Thymovac® (Cepa Cux-1), las cuales están indicadas para uso en reproductoras. La decisión de vacunar o no queda en manos de cada productor, y se toma sin fundamentos epidemiológicos, debido a que en el país no hay estudios de prevalencia e incidencia de CIAV.

Algunos reportes de CIAV en Colombia se basan en la detección de anticuerpos mediante la prueba de ELISA y análisis de casos con descripción de las lesiones, pero ninguno determina la presencia del virus, ni las características de este. Los autores concluyen que en aves de engorde la infección depende en gran medida si se tienen anticuerpos maternos al primer día, ya que se observa que los que no presentan anticuerpos tienen un bajo desempeño en los parámetros zootécnicos (109) y que probablemente la seroconversión a los 42 días indica una exposición al virus de campo (108).

El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia del Virus de la Anemia Infecciosa Aviar (CIAV) en aves del norte y oriente del Departamento de Antioquia, determinando la dinámica de positividad para PCR del virus durante la etapa de levante y caracterizando las cepas del CIAV presentes en las granjas estudiadas mediante RFLP.

5.2 Metodología

Se evaluaron 4 granjas del norte y oriente de Antioquia (remitirse al capítulo 2, apartados 2.2.2 y 2.2.3).

⁴⁵ Instituto Colombiano Agropecuario (ICA)

⁴⁶ Encefalomiелitis aviar cepa Calnek

⁴⁷ Virus de la viruela (Gibbs)

⁴⁸ Virus vivo de anemia infecciosa aviar cepa 26P4

5.2.1 Material biológico

Virus. Como control positivo para la PCR de CIAV se utilizó la cepa Cux-1 ⁴⁹ (Avipro Thymovac).

5.2.2 Extracción de DNA.

La extracción de DNA se realizó a todas las muestras de sangre y vacuna usando el Kit QIAamp® DNA Blood and tissue (www.qiagen.com, cat # 69506), siguiendo las recomendaciones del fabricante; La elución final fue de 120 µL. Una vez extraído el DNA, se cuantificó mediante Nanodrop (Thermoscientific UBMC-ESP) y se verificó la calidad mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.0%. De igual manera se procedió con las cepas de los virus que se usaron como control positivo para PCR.

5.2.3 PCR convencional

Para la detección de material genético del Virus de la Anemia Infecciosa Aviar se utilizaron los iniciadores 5'-GCGCACATACCGGTCGGCAGT-3' (sentido) y 5'-GGGGTTCGGCAGCCTCACACTAT-3' (reverso), que amplifican un fragmento de 713 pb correspondientes al gen VP2 y los iniciadores 5'-AGCCGACCCCGAACCGCAAGAA'3' (sentido) y 5'-TCA GGG CTG CGT CCC CCA GTA CA-3' (reverso), que amplifican la región VP1 de 1390 pb. Estos dos pares de iniciadores cubren por completo el genoma del CIAV (38). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL utilizando 400 mM de dNTP, 1 mM de cada iniciador, 4 mM de MgCl, 1X de Buffer PCR, 2.5 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen) y 1 µL de DNA (40 ng/µL). Las condiciones de la amplificación para VP2 fueron una desnaturalización inicial de 94 °C durante 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 62 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos, y una extensión final de 72 °C por 10 minutos; mientras que para

⁴⁹ Vacuna AVIPRO THYMOVAC. del Laboratorio Lohmann Animal Health (Registro ICA 8649).

VP1 fueron una desnaturalización inicial de 94 °C por 5 minutos, 34 ciclos de 90 °C por 1:00 min, 60 °C por 1 min, 72 °C por 2 minutos y elongación final de 72 °C por 15 minutos.

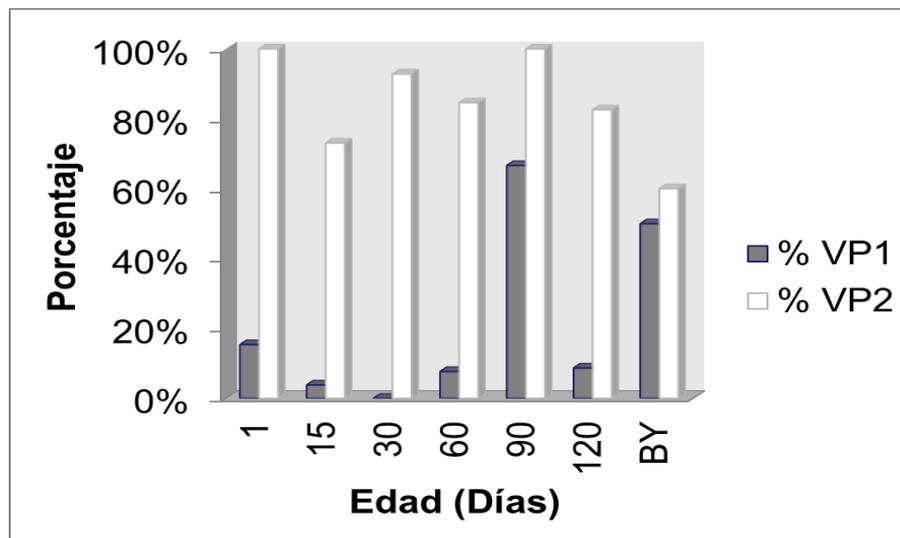
5.2.4 Análisis por endonucleasas de restricción

Los amplificadores, previamente purificados son digeridos en forma independiente por medio de las endonucleasas *HaeIII*, *Hinfl*, *Hha I*, *Ddel* y *HpaII* para VP1. Para VP2 se usan *HaeIII* y *Mbol* (38,99). La reacción se lleva a cabo en un volumen final de 30 µl de los cuales 20 µl son del producto amplificado, 2 µl del amortiguador 1X que recomienda el fabricante (Buffer tango) y una unidad de enzima. Se incubaba a 37 °C por seis horas y los productos de digestión se separarán en geles de poliacrilamida al 10% durante 45 minutos a 100 V; las bandas se revelan usando el Kit colorante de plata (BioRad cat #1610443).

5.3 Resultados

Los resultados que se presentan a continuación es un consolidado por edad de todas las granjas.

5.3.1 Presencia del CIAV en las granjas evaluadas durante su etapa de levante



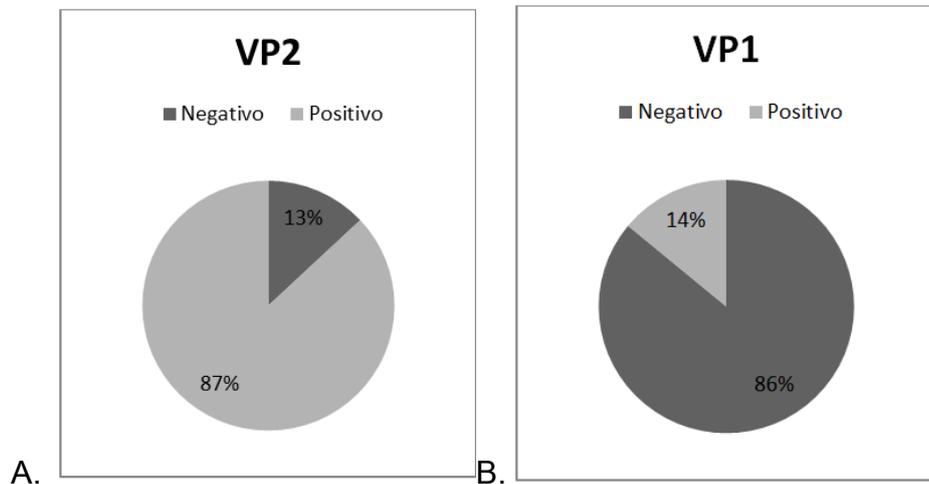
Gráfica 8: Dinámica de positividad por PCR para CIAV. BY: aves de traspatio.

Todas las granjas evaluadas fueron positivas para el CIAV por PCR, a pesar de que ninguna utiliza vacuna contra este agente. En sangre se encontró un 14% (14/101) de positividad para VP1 (Gráfica 10 B), y 86% (87/101) para VP2 (Imagen 5) (Gráfica 10). En el gráfico 9 se observa la dinámica de positividad durante la etapa del levante, con porcentajes por encima del 70% en todas las edades evaluadas, siendo el día 15 el de menos positividad y los días 1 y 90 de mayor positividad. En las aves de traspatio (TP) se encontró que la positividad fue para el 50% de las muestras.

Las muestras de pluma presentaron positividad en el 4,16% para VP1, mientras que para VP2 se observó un 80,5%.



Imagen 4: PCR para VP2. Fragmento esperado de 713 pb. Eje horizontal= MW: marcador de peso molecular 100 pb. 1-16: Algunas de las muestras. C+: control positivo, DNA vacuna. C-: control negativo. Electroforesis en gel agarosa 1%.



Gráfica 9: Porcentaje global de Positividad para gen VP2 (A) y VP1 (B) en las muestras de sangre.

Al comparar la positividad para ambos genes en las muestras se encontró que es de un 14% para VP1, mientras que en VP2 se tiene el 86%. El gen VP2 es un fragmento conservado entre las cepas, mientras que el gen VP1 codifica una region hipervariable que corresponde a la cápside (Gráfica 10).

5.3.2 Estandarización de la RFLP con cepa control

Se realizó la estandarización de la técnica de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés) con las diferentes enzimas (6 en total). Sin embargo, aún no se ha llevado a cabo en las muestras ya que tuvieron baja positividad para el gen *VP1* y es este el que permite caracterizar en los diferentes grupos de acuerdo a su patrón de corte.

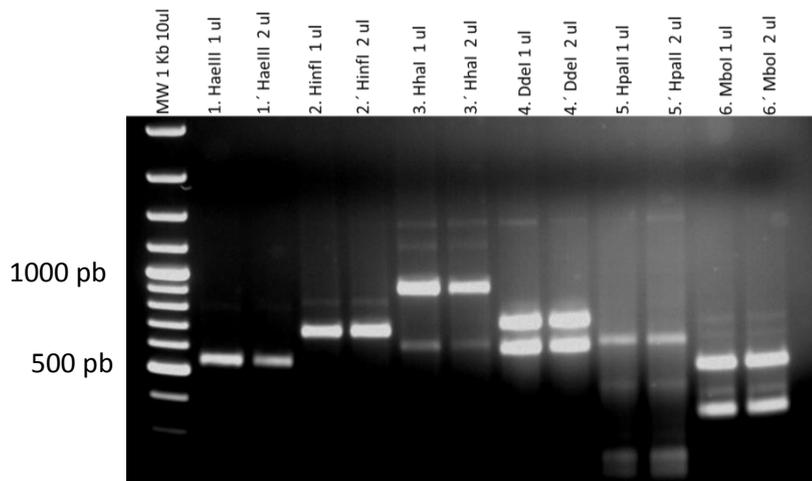


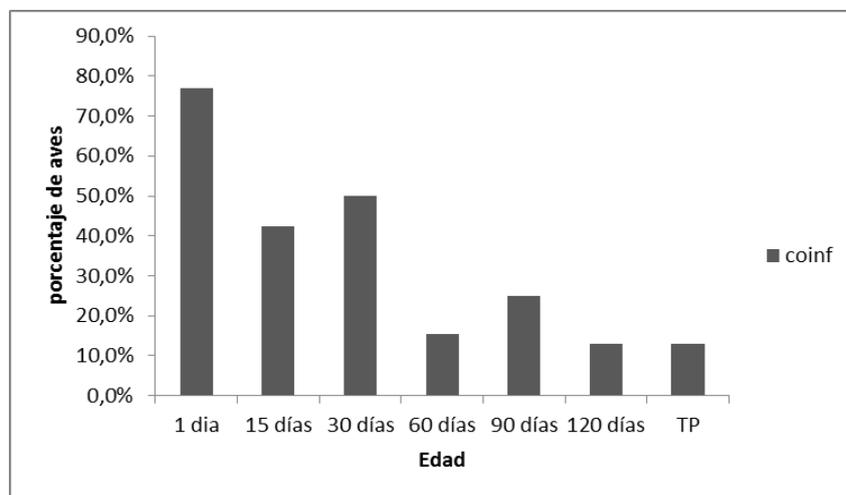
Imagen 5: Digestión del control positivo con 6 enzimas (HaeIII, HinfI, HhaI, DdeI, HpaII, MboI). Electroforesis en gel agarosa 2%. MW: marcador de peso molecular 100 pb. 1-6: Enzimas (1 y 2 μ L).

Se determinó que es necesario 1 μ L de la enzima para un volumen final de 30 μ L, usando 20 μ L del producto de PCR y 2 μ L del buffer. La digestión debe ser llevada a cabo durante 6 horas a 37° C y luego proceder a la inactivación de la enzima (65- 80° C de acuerdo a cada una). La separación de las bandas se

revela con una solución de nitrato de plata 0,1 gr y 150 µL de formaldehído 37%, ajustado a 100 mL agua destilada. La fijación de la tinción se realiza con una solución al 10% de ácido acético glacial.

5.3.3 Coinfección con el Virus de la enfermedad de Marek.

Al evaluar todas las muestras positivas para CIAV (VP2), se encontró que el 31% de estas muestras también fueron positivas para GaHV-2 y el 100% para MeHV-1. En la gráfica 11 se puede observar como fue el comportamiento de la coinfección (PCR VP2 y PCR GaHV-2) con respecto a la edad.



Gráfica 10. Porcentaje de coinfección con CIAV y MDV (GaHV-2).

Se observa como en las primeras edades se encuentra mayor porcentaje de aves positivas a ambos virus, y que disminuye con la edad.

5.4 Discusión:

El gen VP1 es el que permite caracterizar las cepas por medio de fragmentos de restricción, debido a que se tiene establecido los puntos de corte para 7 grupos diferentes (38,88,99), o con su secuenciación y análisis filogenético (274, 275, 276). Las cepas circulantes de CIAV que se encontraron en el presente estudio, al parecer difieren de la vacunal y tiene poca identidad para

los cebadores utilizados para el gen *VP1*. Como consecuencia, se sugiere realizar secuenciación (ver apartado 5.5 Perspectivas) de las muestras para determinar a que cepa corresponden, y diseñar un par de cebadores que se adapten a éstas, además de verificar los sitios de corte con las enzimas para crear el patrón de polimorfismo. También se propone mejorar la sensibilidad de la PCR, cambiando las condiciones ya establecidas.

La positividad del 100% de las granjas muestreadas es superior a los hallazgos de otros autores en latinoamérica (105,107,221), las 4 granjas evaluadas presentaron aves positivas para CIAV. Sin embargo, el porcentaje de positividad de aves (número de aves positivas por cada granja) se correlaciona con lo reportado por seroprevalencia en otros países como india (86%) (222), Jordan (35-100%), Hungría (93.3 a 100%) (8), y china (87%) (223).

Todas las aves que resultaron positivas a CIAV (por *VP2*) también lo fueron para *MeHV-1*, el cual no es virulento y es una de las cepas con las que se vacuna. La positividad de estas muestras para *MeHV-1* se confirmó por rt-PCR y se secuenciaron algunos de los productos de PCR para confirmar su identidad con la cepa del serotipo 3 de MDV. Para descartar la contaminación se contó con control negativo en cada PCR, y además se secuenció el control positivo, para establecer diferencias entre las positivas y el control, de forma que no ocurriera una contaminación con este mismo.

Se resalta el hecho de encontrar positividad para CIAV desde el primer día, al contrario de lo que encuentran en otros estudios, en donde los animales seroconvierten a partir de las 6-8 semanas (224), lo que quiere decir que entran en contacto con el virus entre las 4 y 5 semanas. Al encontrar genoma viral desde el día uno puede indicar transmisión vertical o infección en la incubadora. Se deben realizar estudios de seroprevalencia para verificar el nivel de anticuerpos contra anemia en las aves durante los primeros días, y si los títulos son protectores contra la infección, ya que la infección con CIAV

durante las tres primeras semanas puede llevar a la presentación de signos clínicos e inmunosupresión.

5.5 Perspectivas

Se seleccionarán las muestras positivas a PCR para VP2 de CIAV. Para la secuenciación de VP1 se utilizarán los iniciadores diseñados por Craig M, *et al.*, 2009 (276): VP1-AF: CAAGAAGGTGTATAAGACTG, VP1-AR: ATCGCTGCTGTACTTAACAT y VP1-BF: GAAACCCGCTTTCAGCT, VP1-BR CAGTACATGGTGCTGTT. La amplificación se realizará en un volumen final de 50 μ L con 4 μ L de DNA, 5 μ L del Buffer 10X, 1 μ L de dNTPs a 10 mM, 3 μ L de $MgCl_2$ a 25 mM, 0,25 μ L de Taq polimerasa 5U/ μ L y 1 μ L de cada iniciador a 5 mmol. Las condiciones del termociclador serán desnaturalización inicial de 5 min a 95° C, seguido de 35 ciclos de 95° C por 30 seg, 47° C por 30 seg, y 72° C por 2 min, seguidos por una extensión final de 72° C por 10 min. Estos productos serán purificados y procesados en un secuenciador automático (Applied Biosystems, U.S.A) utilizando el kit de terminación big dye (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Número catálogo 4337455). Las secuencias serán ensambladas con el programa SeqMan (DNA Star Laser gene software package, Madison, WI, USA). Las secuencias consenso de aminoácidos y nucleótidos de cepas colombianas y de referencia serán alineadas por el método ClustalW, usando el programa MegAlign de Lasergene Software (DNASTAR Inc., USA). Para el análisis filogenético de las cepas del CIAV se usará el software MEGA 3.1 (225).

Una vez se tenga la secuencia, se diseñarán los cebadores para la detección del gen VP1 con el programa Primer3 (simgene.com) y posteriormente se correrá BLAST para verificar su porcentaje de identidad para el virus, junto con una PCR – RFLP insilico para verificar el amplificado y los puntos de corte con las enzimas.

Capítulo 6: Publicación en Revista Plumazos # 51. 2015. AMEVEA Colombia.

La inmunodepresión subclínica- Un problema importante en los sistemas de
producción avícola

*LÓPEZ SARA^{50,51}, PIEDRAHITA DIEGO⁵², RAMÍREZ GLORIA C⁵³,
ARANZAZU DIEGO⁵⁴, WILLIAMS SUSAN⁵⁵, CHAPARRO JENNY.^{1,56}*

Correspondencia autor: jenny.chaparro@udea.edu.co

En los últimos 20 años la inmunodepresión se ha convertido en uno de los problemas más preocupantes para los avicultores, ya que induce mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas y disminución de la producción; este cuadro está asociado principalmente a la intensificación de los sistemas productivos y representa pérdidas económicas para el avicultor y disminución del bienestar para el animal. Hoy en día, existen varios métodos para acercarse al diagnóstico de la inmunodepresión, los cuales se basan en evaluar la integridad funcional de los órganos linfoides. La detección de una alteración subclínica a nivel microscópico en estos órganos permite determinar la presencia de la enfermedad inmunosupresora y por lo tanto se podrán tomar decisiones de manejo poblacional, previniendo manifestaciones clínicas con impacto negativo en los sistemas de producción. El objetivo de este estudio fue evaluar por medio de histopatología los órganos linfoides de aves de levante en condiciones normales de cría, para evidenciar posibles cambios asociados con inmunodepresión subclínica; para esto se evaluaron órganos linfoides de 12

⁵⁰ Grupo CENTAURO, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia.

⁵¹ MV MSc (c)

⁵² MVZ. MSc. PhD. Universidad de Antioquia.

⁵³ MV. MSc. PhD. Universidad Nacional de Colombia.

⁵⁴ MV. Esp, Patólogo, MSc. Universidad de Antioquia.

⁵⁵ MV. MSc. PhD. Pathologist PDR. University of Georgia.

⁵⁶ MV. MSc. PhD. Universidad de Antioquia.

aves por edad (días 1, 15, 30, 60, 90 y 120); se realizó extracción y fijación en formalina bufferada al 10% de fragmentos de bazo, timo y bursa de Fabricio y luego del análisis empleando histopatología de rutina con coloración de Hematoxilina-Eosina, se encontró alteración de la integridad de los órganos linfoides entre los 15 y los 60 días de edad. Los cambios consistieron en una depleción linfoide severa en bazo a los días 30 y 60, mientras que en tejido de la bursa esta alteración fue más frecuente en el día 15 y el timo presentó depleción de la corteza en grado moderado a severo al día 60. Estos resultados sugieren que en condiciones normales de manejo, las aves están siendo retadas con agentes tanto infecciosos como no infecciosos que generan daño en diferentes órganos linfoides, comprometiendo el funcionamiento normal del sistema inmune, con una probable respuesta ineficiente a las vacunas y potencial susceptibilidad a infecciones secundarias con repercusiones negativas en los parámetros productivos de las aves.

Palabras claves: histopatología, inmunosupresión subclínica, aves de postura, Antioquia-Colombia

Keywords: *Histopathology, Immunosuppression, Young layers, Antioquia-Colombia.*

6.1 Introducción

La inmunodepresión se ha convertido en uno de los problemas de mayor impacto económico para la industria avícola, debido a la alteración que produce en la salud y bienestar de las aves y las consecuencias que esto genera para la producción. Esta perturbación puede definirse como un estado de disfunción temporal o permanente de la respuesta inmune por una lesión en los órganos que hacen parte del sistema inmunológico, generando así un aumento en la susceptibilidad a los agentes infecciosos, mala conversión alimenticia,

mortalidad y falta de respuesta adecuada a las vacunaciones. La afección del sistema inmune es de carácter multifactorial y está fuertemente asociada a la intensificación de los sistemas de producción (4,226,227).

Como ejemplo de agentes inmunosupresores se pueden nombrar el Virus de la Enfermedad de Marek (MDV), Virus de la Anemia Infecciosa Aviar (CIAV), Virus de la Retículo Endotelosis (VRE), Reovirus, Virus de la Leucosis Aviar, Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio (VEIBF) y las coccidias(23). Dentro de las causas no infecciosas de la inmunodepresión en las aves están los factores ambientales, nutricionales, toxinas y condiciones de manejo que generen estrés en el animal (6). Ver diagrama 1.

Las infecciones causadas por agentes virales inmunosupresores son de distribución ubicua, siendo fácilmente ignorados debido a su carácter subclínico; esto se ha descrito en casos de infección por MDV, VEIBF, CIAV y REV(228–230). La enfermedad con estos virus avanza sin ser detectada, distribuyéndose por toda la parvada y alterando la función de los órganos linfoides primarios como el timo (VRE, CIAV, MDV), bursa de Fabricio (VEIBF, CIAV), médula ósea (CIAV) y, órganos linfoides secundarios como el bazo (VRE CIAV), e hígado (231–234). Sin embargo, el daño se hace evidente cuando hay alteraciones graves en los órganos que comprometen su correcto funcionamiento y por lo tanto perjudican el desempeño de las aves. En países como Estados Unidos de América, se han reportado pérdidas de más de 2.300 millones de dólares al año como consecuencia directa de la inmunodepresión (3). En Colombia se calculan pérdidas millonarias⁵⁷ por mortalidad como consecuencia directa de agentes inmunosupresores⁵⁸ (235).

⁵⁷ ICA. Sistema de Información y Vigilancia Epidemiológica. COLOMBIA, SANIDAD ANIMAL 2008. INFORME TÉCNICO Bogotá, D.C., 2009

⁵⁸ MDV, Coccidiosis, Micotoxinas.

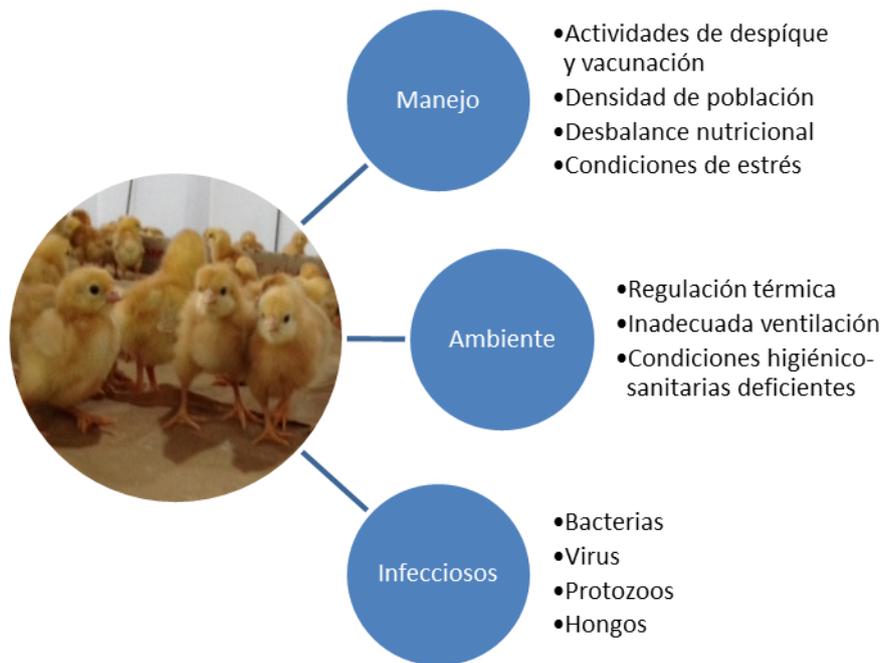


Ilustración 6: Causas de inmunosupresión en aves.

El control de estos agentes infectocontagiosos se logra al adoptar medidas estrictas de bioseguridad y un programa de vacunación completo, sin embargo el éxito de este programa dependerá de la integridad del sistema inmunológico del ave (236) Actualmente se cuenta con diferentes técnicas de diagnóstico para evaluar la integridad de los órganos linfoides; dentro de los métodos rutinarios están la serología, evaluación macroscópica y microscópica, evaluación de los parámetros productivos e identificación de agentes infecciosos (117). Un problema constante es poder realizar la detección de la inmunodepresión subclínica con estos métodos diagnósticos, debido a la complejidad de la patología y su carácter multifactorial, lo que implica necesariamente el uso de pruebas complementarias, como cuadro hemático, identificación de factores inmunológicos solubles, diagnóstico de agentes por técnicas de biología celular y molecular (237).

Por todo lo anterior, los métodos microscópicos constituyen una herramienta clave para determinar el estado subclínico de inmunosupresión(238–241); el daño a nivel celular precede a la aparición de signos clínicos de una

enfermedad, por lo que una detección temprana permitirá tomar decisiones de forma rápida, con el fin de evitar consecuencias no deseables en la salud de las aves y por tanto en los parámetros productivos de las granjas. Un hallazgo frecuente es la atrofia de la bolsa de Fabricio y agotamiento de los linfocitos a nivel de los folículos, como resultado directo de la acción de algunos agentes infecciosos (226).

En este estudio se evaluó por medio de histopatología los órganos linfoides de aves de levante en condiciones normales de cría, para evaluar la presencia de estados subclínicos de inmunosupresión. Estos resultados sugieren que la detección temprana de lesiones relacionadas con inmunosupresión subclínica es una herramienta valiosa para orientar el diagnóstico específico con miras a diseñar programas de prevención y control eficaces, en los sistemas productivos avícolas del país.

6.2 Metodología

El estudio se desarrolló en aves provenientes de la región norte y oriente del departamento de Antioquia, Colombia. Ambas regiones se encuentran en una zona de vida de bosque muy húmedo montano bajo, con una altura sobre el nivel del mar por encima de los 2000 metros y precipitaciones entre los 900 mm hasta los 1800 mm (242). Las granjas avícolas se encuentran ubicadas en los municipios de Guarne, San Vicente, Belmira y San Pedro de los Milagros.

a. Población y tamaño de muestra

Se evaluaron 4 granjas con una población total de 212.000 aves (Granja 1 N= 30.000; Granja 2: N=20.000; Granja 3: N=62.000; Granja 4 N= 100.000). Todos los sistemas de cría y levante se realizaron en piso siguiendo los estándares de producción sugeridos por cada casa genética. El plan sanitario fue diferente para cada granja pero cumpliendo lo establecido por la resolución ICA 3642 del

2013. El tamaño de muestra fue acordado con los propietarios de las granjas, quienes establecieron un máximo de 3 aves por edad. La muestra se tomó en los días 1, 15, 30, 60, 90 y 120 durante el levante; en cada edad se seleccionaron al azar tres aves (18 animales por granja) para un total de 72 aves. Se incluyeron aves sanas que cumplieran con la edad de acuerdo al punto de muestreo y se excluyeron aves con signos clínicos de enfermedad.

b. Muestreo

Las aves evaluadas se sacrificaron siguiendo los protocolos establecidos por la FAO (243). La necropsia se llevó a cabo de forma sistemática por un médico veterinario, registrando los hallazgos macroscópicos y evaluando el estado de salud general de cada animal. Se extrajeron los órganos timo, bazo y bursa, de los cuales se conservaron fragmentos de 0.5x0.5 mm en formalina bufferada al 10%.

c. Histopatología

Luego de 24 horas de fijación en la formalina, las muestras se deshidrataron y embebieron en parafina. Se realizó un corte de 4 μm , el cual se tiñó con Hematoxilina- Eosina. La lectura fue realizada por la doctora Susan Michell Williams DVM, PhD, Patóloga aviar de la Universidad de Georgia y doctor Diego Aránzazu Esp. Patólogo, MSc, de la Universidad de Antioquia.

Para comparar la severidad de las lesiones se utilizó una escala ordinal de acuerdo a las lesiones microscópicas. Para timo y bazo se utilizó una escala de 1 a 4: **Grado 1**. Sin alteraciones; **Grado 2**. Leve disminución del número de linfocitos, nivel focal (menor de 25% de afección); **Grado 3**. Moderada disminución del componente linfoide (del 25% al 50% de linfocitos afectados), disminución del tamaño del órgano, focal- multifocal; **Grado 4**. Disminución de

componente linfoide grave o difusa, además de atrofia o necrosis (mayor al 50%) (117).

Para la clasificación microscópica de la bursa se usó la siguiente escala ordinal: **Grado 1.** folículos aislados con depleción leve (0 al 10%); **Grado 2.** depleción linfoide moderada (10 al 30%) y generalizada o folículos aislados con depleción linfoide severa, marcado epitelio intra-folicular; **Grado 3.** depleción linfoide severa en 30 al 50% de los folículos; **Grado 4.** folículos con escasos linfocitos y con quistes, aumento del tejido conectivo, epitelio engrosado y con pliegues, marcada fibroplasia (244)

6.3 Resultados y discusión

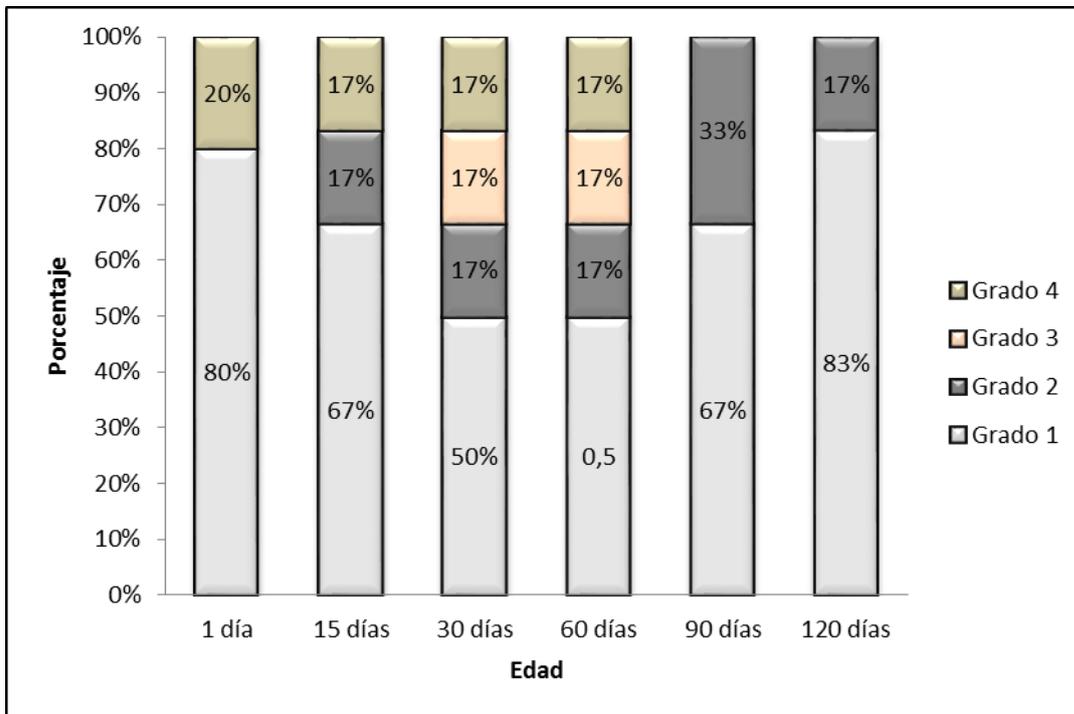
6.3.1 Hallazgos histopatológicos en tejido de bazo

El bazo de las aves es un órgano redondeado ubicado en posición dorsal al proventrículo (245); este se encarga de filtrar la sangre y extraer partículas antigénicas del sistema circulatorio, almacena eritrocitos y plaquetas y durante la vida fetal participa en la eritropoyesis. Histológicamente se puede dividir en dos zonas, la pulpa roja encargada del almacenamiento y captación de los eritrocitos y la pulpa blanca, donde hay alta actividad inmunológica (63,246).

En este estudio se encontró que el 66% del tejido de bazo evaluado, presentaron clasificación **Grado 1** (normal), 17% se clasificaron como **Grado 2** (depleción leve), 6% en **Grado 3** (depleción moderada) y 11% en **Grado 4** (depleción severa).

En cuanto a la distribución de los hallazgos por edades, se observa una frecuencia predominante del **Grado 1** en todas la etapa de levante; en los días 30 y 60 aumenta el porcentaje de tejidos con clasificación **Grado 3** y **Grado 4**,

mientras que a los 120 días la clasificación es **Grado 1** en más del 80% de las aves evaluadas. (Gráfica 12).

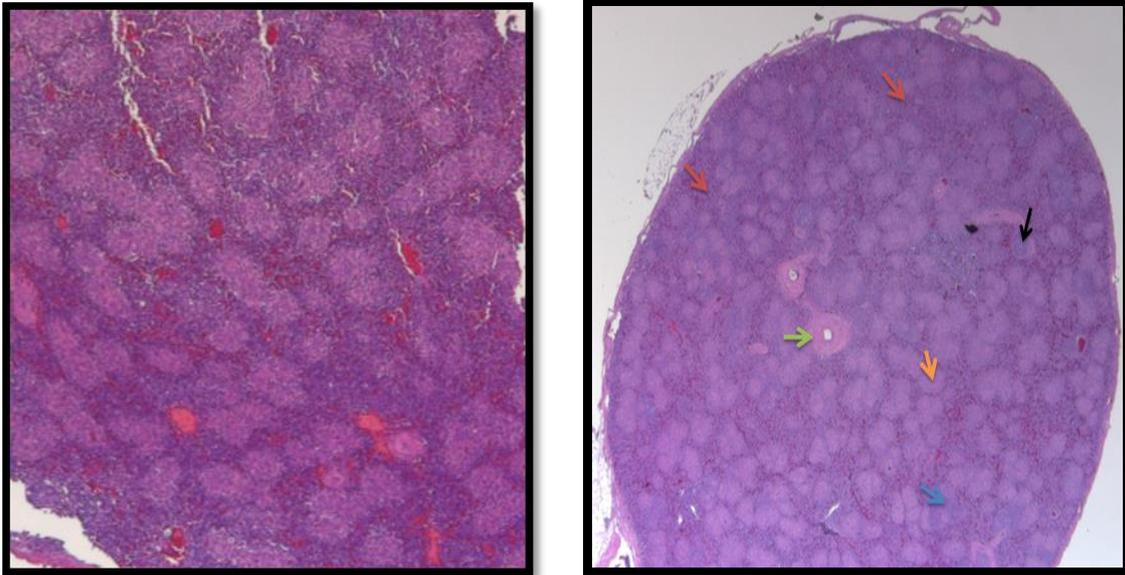


Gráfica 11: Porcentaje de tejido (bazo) con clasificación histopatológica en escala nominal durante la etapa de levante.

Se observa un porcentaje considerable de lesiones histopatológicas **Grado 4** (17% a 20%), entre los días 1 y 60; esta clasificación de depleción linfoide severa, se ha reportado en casos de procesos infecciosos (247). Secundario a la acción de agentes infecciosos, existen reportes de que una disminución de los linfocitos es consecuencia de eventos relacionados con necrosis y apoptosis celular, lo que conduce a una atrofia del órgano y alteraciones funcionales del mismo (117).

Dentro de las lesiones histopatológicas específicas encontradas están: 1) depleción del componente linfoide en diversos grados en un 16,12% (imagen 7); 2) cambios en el componente celular o proliferación de células linfoides

(centros germinativos) en un 9,6%; 3) retrofagocitosis en un 6,4% y 4) necrosis en un 3%.



A

B

Imagen 6: Corte histológico de Bazo. A. Bazo. Ave de levante 15 días. Normal. Aumento 50X.

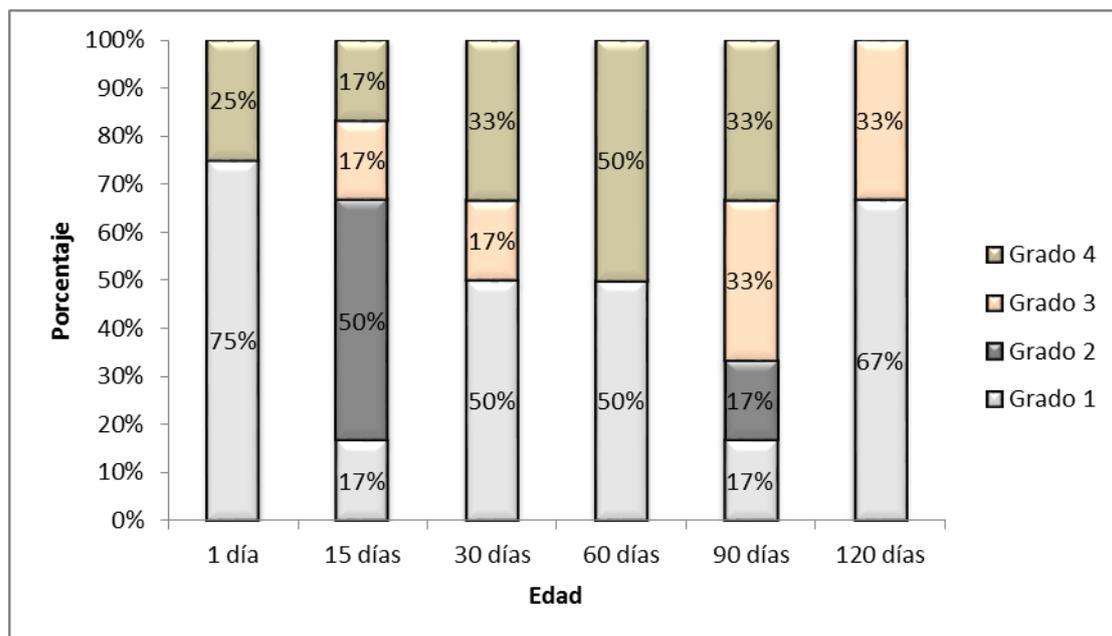
B. Bazo. Ave de levante 30 días de edad. Aumento 16X. Hiperplasia reticular. Se observa aumento en el tejido reticular (Flecha naranja). A nivel histológico, el bazo presenta una pulpa blanca difusa (flecha azul), con linfocitos pequeños, medianos y grandes, rodeados por células reticulares. Estas células, forman el tejido linfoide periarterial, que envuelve las arterias centrales (Flecha verde: manguito linfoide periarterial), y la vaina reticular periarteriolar. Además, el tejido linfoide puede formar centros germinativos o folículos secundarios (Flecha negra), en caso de infecciones (245,248–250). (Flecha roja: pulpa roja)

Las lesiones que se encontraron en el bazo son compatibles con un diagnóstico de inmunosupresión, pero debe ser complementado con otros estudios como: hemograma (recuento total de linfocitos y polimorfonucleares), PCR (para detección de agentes inmunosupresores), y pruebas de funcionalidad *in vitro* de los linfocitos y granulocitos.

6.3.2 Hallazgos histopatológicos en tejido de bursa

La bolsa de Fabrico es un órgano linfoide primario en donde se da la diferenciación de los linfocitos B; macroscópicamente se observa como un saco redondo u ovalado en posición dorsal a la cloaca, que presenta su mayor desarrollo en animales jóvenes e involucionando en la pubertad (251).

El 44% de las bursas evaluadas se clasificaron en el **Grado 1**, el 12% en el **Grado 2**, el 18% en el **Grado 3** y el 26% en el **Grado 4**. Estos resultados muestran consistentemente que en el periodo de los 30 a 90 días hay un alto porcentaje (33%-50%) de bursas en **Grado 4**, confirmándose de esta manera el grado de afectación de este órgano linfoide prácticamente en toda la etapa de levante. (Gráfica 13)



Gráfica 12: Porcentaje de tejido (bursa) con clasificación histopatológica en escala nominal durante la etapa de levante.

Las posibles causas asociadas a la clasificación se enumeran en la tabla 12.

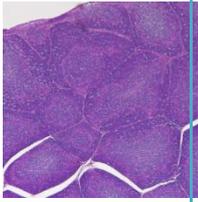
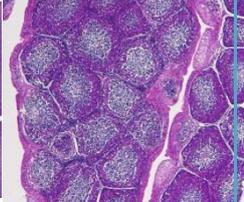
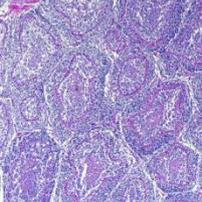
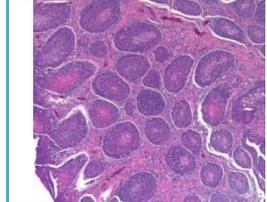
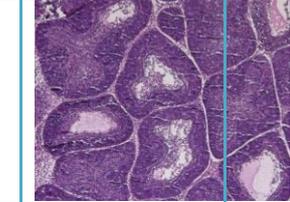
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	NECROSIS
Depleción	0- 10%	Leve: 10 – 30%	Moderada: 30- 70 %	Severa: > 70%	Varios.
Causas	Nutricional/ ambiental	Nutricional/ Ambiental/ vacunas	IBDV, CAV.	Infecciones: cryptosporidium, CAV, IBDV, vv+MDV	Bacterias. IBDV v++
Descripción	Folículos con corteza y médula bien definida. Alta densidad celular. Capa de tejido interfolicular delgada.	El epitelio intrafolicular se hace más evidente, densidad moderada en corteza y médula. Folículos pequeños pero con componentes normales.	El epitelio intrafolicular se ve claramente. Baja la densidad celular en la corteza folicular. Folículos pequeños, tejido fibrinoide de mayor tamaño entre los folículos.	Folículos pequeños o sin componente celular adecuado. Tejido fibroso abundante. Epitelio folicular angular.	Pérdida de componente celular severa conformación de estructura quística en los folículos.
Imagen					
Magnificación	50X	50X	50X	50X	50X

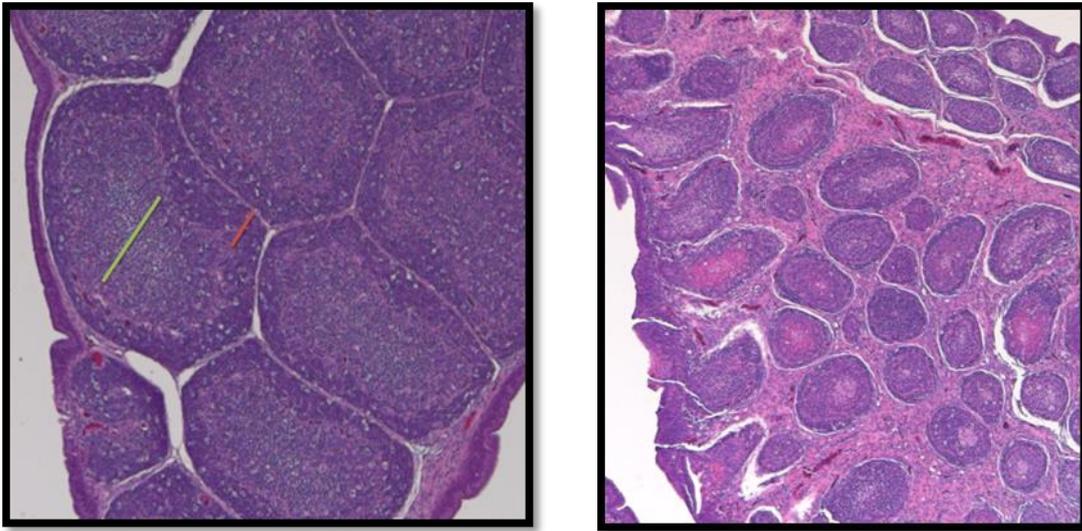
Tabla 13: Grado de lesión a nivel microscópico en la bursa de Fabricio

Fuente: Adaptada de Williams, 2014

En este estudio se observó inicio de regresión fisiológica en las bolsas a los 120 días de edad. La regresión es un proceso de presentación variable que se inicia a principios de la madurez sexual (252,253).

Adicionalmente, los resultados de este trabajo muestran incremento del tejido fibroso durante la segunda semana de edad, contrario a lo reportado por la literatura en donde se establece que el tejido fibroso suele presentarse en baja cantidad a nivel estromal durante las 6 primeras semanas de vida (imagen 8). También se reporta que la bolsa alcanza su desarrollo a las 4 semanas de edad y posteriormente reduce su tasa de crecimiento y desarrollo (85,254).

Nova, en el 2007 reporta para Colombia que en aves expuestas a cepas muy virulentas del VEIBF se presenta lesión **Grado 3** entre las 4 y 5 semanas (255).



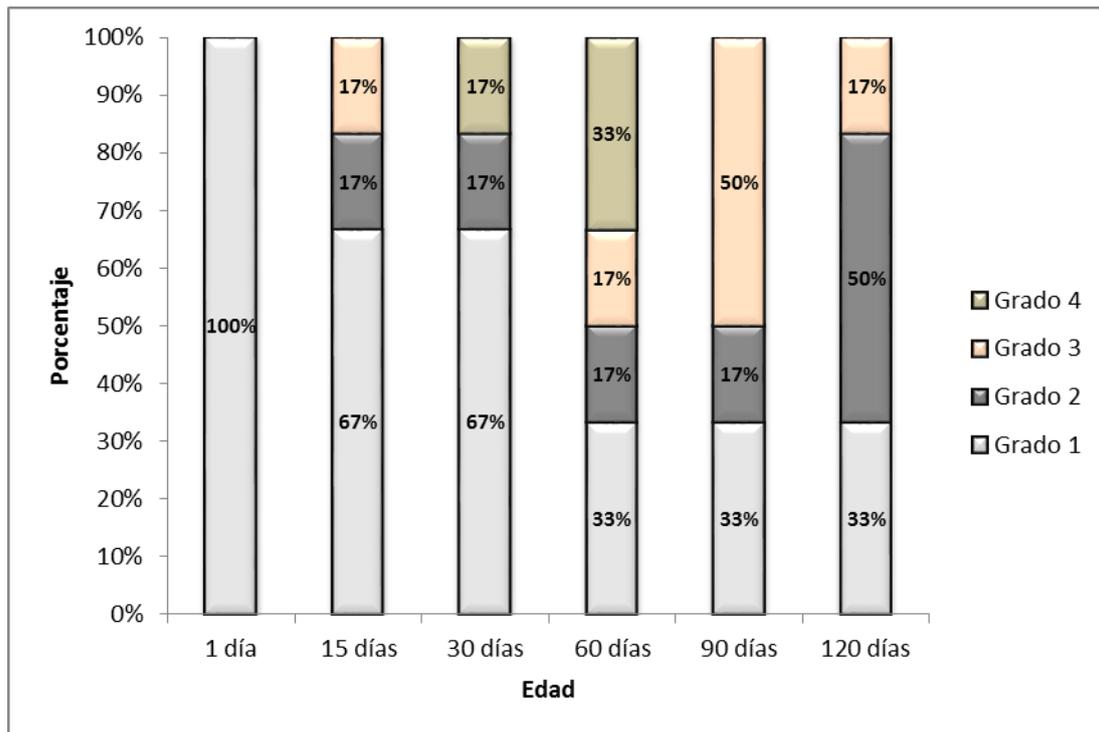
A

B

Imagen 7: Corte histológico de Bursa de Fabricio. **A.** Bursa normal. 50X. Ave 60 días. **Grado 1.** El epitelio situado sobre los folículos es cilíndrico simple y de él derivan las células retículoepiteliales que conforman el estroma del folículo. En los folículos se diferencia una zona periférica o corteza, línea roja, ocupada por numerosos linfocitos pequeños y una zona central o médula, línea verde, ocupada por linfoblastos. Ambas zonas aparecen separadas por una trama capilar (251). **B.** Bursa. 50X. Ave levante 60 días. **Grado 4.** Se evidencia abundante tejido fibrinoide en septos interfoliculares. Disminución del tamaño de los folículos y pérdida del componente celular en ellos. El epitelio intrafolicular se observa fácilmente en la mayoría de folículos.

6.3.3 Hallazgos histopatológicos en tejido de timo

El timo es un órgano linfoide primario, necesario para el desarrollo de la respuesta inmune celular (246) Tiene apariencia glandular y se localiza a lo largo del nervio vago (256). Los lóbulos contienen células epiteliales y cada uno se encuentra cubierto por una cápsula de tejido conectivo; cada lóbulo presenta una zona llamada corteza, que posee linfocitos y una parte interna, llamada médula, contiene las células epiteliales (256).

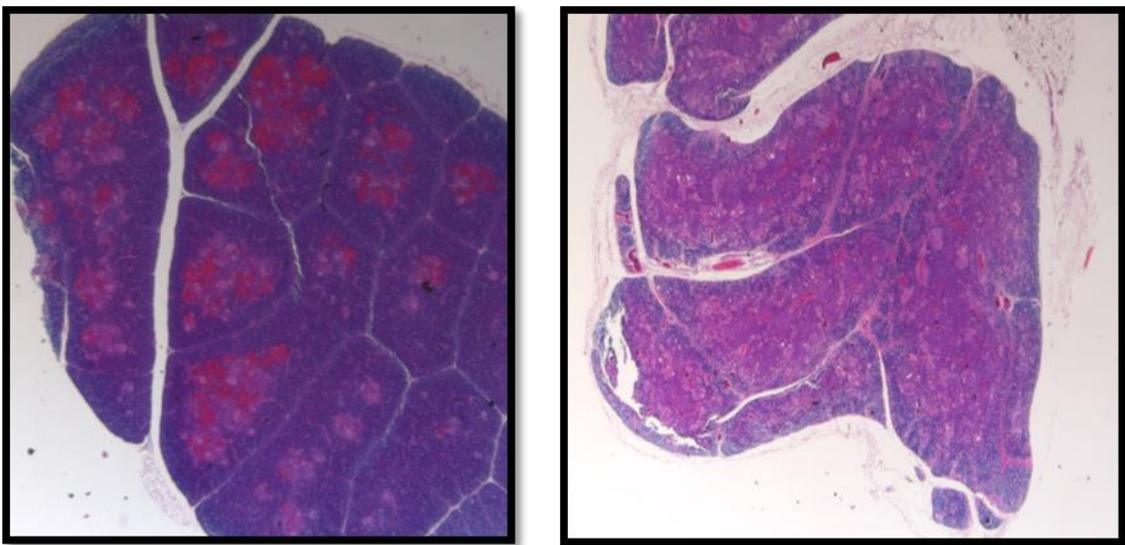


Gráfica 13: Porcentaje de tejido (timo) con clasificación histopatológica en escala nominal durante la etapa de levante.

El 100% del tejido de timo evaluado se clasifica en **Grado 1** al primer día de edad; por su parte se observa una reducción constante para **Grado 1** a medida que se avanza en la etapa de levante, mientras que el **Grado 2** aumenta hasta encontrar un máximo del 50% a los 120 días; para el **Grado 3** hay un comportamiento similar, teniendo un porcentaje del 50% a los 90 días; adicionalmente, se observa que el mayor porcentaje de **Grado 4** se da a los 60 días con un 33% (Gráfica 14).

Los resultados de este estudio, muestran un aumento de alteraciones morfológicas del timo durante la etapa de levante, destacándose una atrofia cortical severa, lo que puede estar afectando directamente la respuesta inmune celular e indirectamente la respuesta inmune humoral (ver Figura 3). La disminución transitoria de los linfocitos corticales está asociada a infecciones con VEIBF (257), pero el órgano tiende a la recuperación. El CIAV es la principal causa de atrofia del sistema inmune y alteración a nivel de timo;

siempre que se encuentren lesiones en este órgano se debe incluir dentro de los diagnósticos diferenciales la infección por este virus (7). Es de aclarar, que la atrofia que se da normalmente cuando el ave alcanza la madurez sexual, se caracteriza por cambios en el tamaño sin reducción o alteración de la proporción entre corteza y médula (244). Las lesiones observadas en los timos, coinciden con las descritas por McNulty (1991) (43), y Rosenberger y Cloud (1998) (258), quienes informan que el CIAV produce en el timo atrofia, congestión y depleción linfocitaria tanto en corteza como en médula.



A

B

Imagen 8: corte histológico de Timo. **A.** Timo. Normal. Ave 15 días. Vista 16X. Se encuentra corteza del timo con abundantes linfocitos, y la médula que tiene menos densidad en la celularidad; la población de células es mixta y su apariencia es más pálida. Las células que se encuentran en la médula son: macrófagos, células plasmáticas, células mieloides, eritrocitos, granulocitos. **B.** Timo. Ave de 30 días de edad: atrofia cortical severa. Vista 16X.

6.4 Conclusiones

Los resultados de este estudio muestran lesiones de nivel moderado a severo en los órganos linfoides de aves durante los dos primeros meses de vida, lo que sugiere que hay un mal funcionamiento del órgano y probablemente mala

respuesta a la vacunación. Por lo anterior, es recomendable el seguimiento histológico de los órganos linfoides de las aves en edades críticas de levante, que permitan evaluar la respuesta tisular y evidenciar a tiempo cualquier cambio relacionado con un estado de inmunodepresión, que directamente puede influir en la presentación de baja conversión alimenticia, reducción en la ganancia de peso, infecciones secundarias y retraso en el inicio de la producción.

Los primeros dos meses de edad de las aves normalmente implican situaciones estresantes como vacunación, despique, cambio de lote, pesaje y transporte, lo que puede llevar a que se observen cambios histológicos en los órganos por elevados niveles de cortisol, pero suelen ser lesiones en niveles leve a moderado. Se debe alertar de posibles infecciones cuando se encuentra depleción moderada o severa, y actuar, tratando de identificar las causas de esta alteración por medio de otras técnicas complementarias para la identificación etiológica específica.

La histopatología es una herramienta que permite obtener información y con base en sus hallazgos realizar un diagnóstico preliminar; sin embargo, la morfología por sí misma no es una medida directa de la capacidad funcional del sistema inmune, lo más recomendable es evaluar directamente la función inmune, pero generalmente estas pruebas son costosas y poco prácticas a nivel de campo.

Este trabajo busca orientar a los productores y profesionales del área para que implementen de forma rutinaria este tipo de diagnóstico y seguimiento, con el fin de realizar un abordaje integrado de las potenciales dificultades que se pueden presentar en los casos de inmunosupresión subclínica en las aves.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con apoyo de Convenio Específico No 001 de 2014 entre AMEVEA y la Universidad de Antioquia. Se agradece a la Estrategia de Sostenibilidad CODI 2013-2014 del grupo Centauro, Universidad de Antioquia, al Laboratorio de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia y al Poultry Diagnostic & Research Center de la Universidad de Georgia, Athens, USA.

Capítulo 7: Characterization of Marek's Disease Virus in a layer farm from Colombia.

López-Osorio S¹. Piedrahita D². Espinal-Restrepo M². Ramírez-Nieto G³. Nair V⁴. Williams S⁵.
Baigent S⁴. Aranzazu D¹. Chaparro-Gutiérrez J^{1,59}

7.1 Summary.

Marek's Disease (MD) is a lymphoproliferative disease caused by an *Alphaherpesvirus*, genus *Mardivirus*, serotype 1 (Gallid Herpesvirus 2, GaHV-2). In addition to Marek's Disease Virus (MDV) serotype 1, the genus also includes two distinct nonpathogenic serotypes: serotype 2 (GaHV-3) and serotype 3 (Meleagrid Herpesvirus 1, MeHV-1) which are commercially available vaccines used against MD. The GaHV-2 serotype includes all known pathogenic strains. As a result of vaccination, clinical signs are not commonly observed, and new cases are usually associated with emerging variant strains against which the vaccines are less effective. In this study, a commercial layer farm showing clinical signs compatible with MDV infection was evaluated. Histological lesions and positive immunohistochemistry in the sciatic nerve and thymus were compatible with cytolytic phase of MD. GaHV-2, GaHV-3 and MeHV-1 were identified by PCR and qPCR in blood samples from 17 birds with suspected MD. Analysis of the Bam-H fragment of GaHV-2 genome by PCR,

-
1. Grupo de investigación Centauro. Universidad de Antioquia. Address: Cr 75 # 65-87. 47 - 241. 050034. San German, Medellín- Colombia.
 2. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
 3. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
 4. Pirbright Institute. Viral Oncogenesis Group. Compton, UK.
 5. Poultry Diagnostic and Research Center. UGA. GA. USA.

resulted in identification of a very virulent (vv+) MDV strain. *Meq* gene analysis revealed a 99% sequence identity with Asian strains, and in the phylogenetic analysis clustered with vv+ MDV. The analysis of amino acid alignments demonstrated an interruption of the proline rich region in P176A, P217A and P233L positions, generally associated with vv+ strains. Some of these changes, such as P233L and L258S positions have not been reported previously. In addition, inoculation of primary cell cultures with lymphocytes isolated from the spleen showed typical cytopathic effect of GaHV-2 at 5 days post infection. This study demonstrates for the first time in Colombia the presence of vv+ MDV infection based on molecular detection and virus isolation.

Key words: Marek's Disease, Colombia, PCR, Field strain, highly virulent strain.

7.2 Resumen:

La Enfermedad de Marek (EM) es una patología linfoproliferativa causada por un *Alphaherpesvirus*, género *Mardivirus*, serotipo 1 (*Gallid Herpesvirus 2*, GaHV-2). Adicionalmente hay dos serotipos no patogénicos que pueden infectar las gallinas: serotipo 2 (GaHV-3) y serotipo 3 (*Meleagrid Herpesvirus 1*, MeHV-1). La enfermedad clínica no es común debido a la vacunación, pero es frecuente la afección subclínica ya que los anticuerpos previenen la aparición de signos pero no la transmisión, inmunosupresión o infecciones secundarias. Los casos clínicos de EM están asociados a nuevas variantes del virus para los cuales las vacunas no son efectivas. En este estudio, se evaluó un lote de una granja avícola de postura con signos de la EM, encontrando resultados de histopatología en nervio ciático e inmunohistoquímica en timo compatibles con la fase citolítica de la EM. En sangre se detectó genoma de GaHV-2, GaHV-3 y MeHV-1 mediante PCR y qPCR. Con la secuenciación del gen *Meq* se evidenció que la cepa tenía 99% de identidad con cepas aisladas en Asia, además se agrupó con cepas vv+ en el árbol filogenético. En el alineamiento de aminoácidos se encontró una interrupción en la posición P176A, P217A y

P233L asociados directamente con cepas de alta virulencia. Se encontraron 2 cambios únicos en las posiciones P233L y L258S, las cuales no habían sido reportadas para otra cepa. Finalmente, para confirmar la presencia del virus, se inocularon cultivos primarios con linfocitos de bazo de aves afectadas, observándose efecto citopático compatible con GaHV-2, 5 días después de la infección. En Colombia, este estudio representa la primera prueba molecular de este virus, así como el primer reporte del aislamiento de una cepa vv+ en el país.

Palabras clave: Enfermedad de Marek, Colombia, PCR, Cepa muy virulenta de campo.

Abbreviations: ADOL: Avian disease and oncology laboratory, USDA; CEF: Chicken embryo fibroblast; CKC: Chicken Kidney Cells; CPE: Cytopathic effect; DEF: Duck Embryo Fibroblast; IBD: Infectious Bursal Disease; GaHV-2: Gallid herpesvirus 2: Serotype 1; GaHV-3: Gallid herpesvirus 3: Serotype 2; ICA: Instituto Colombiano Agropecuario; For: Forward; IHC: Immunohistochemistry; MD: Marek's disease; MDV: Marek's Disease Virus; MeHV-1: Meleagrid herpesvirus 1. Serotype 3; mMDV: Mild Marek's Disease Virus; OIE: World organization for Animal health; PDRC: Poultry Diagnostic and Research Center; Rev: Reverse; UdeA-2013CO: the name of the strain isolated in the clinical case; UGA: University of Georgia; USDA: United States Department of Agriculture; V: Voltios; vMDV: virulent Marek's Disease Virus; vv+ MDV: Very Virulent Plus Marek's Disease Virus; vvMDV: Very Virulent Marek's Disease Virus.

7.3 Introduction

Marek's disease virus (MDV) is the causative agent of a neoplastic disease in poultry that results in the formation of lymphomatous lesions in nerves and visceral organs (151). Marek's disease (MD) occurs as a result of infection with *Gallid herpesvirus 2* (serotype 1), a member of the *Herpesviridae* family, subfamily *Alphaherpesvirinae*, and genus *Mardivirus* (24,259). Primary infection in naïve birds occurs via inhalation of virus particles into the respiratory tract. Viral replication in the lungs stimulates immune cell infiltration whereby MDV preferentially infects adaptive immune system cells. Secondary infection and semi-productive viral replication results in an initial acute cytolytic phase in lymphocytes resulting in immunosuppression (154,260). The virus becomes latent at 6-7 days post infection, allowing for immune evasion; the MDV genome integrates into the genome of CD4+ T lymphocytes without detectable expression levels of the potential antigenic proteins, allowing for systemic dissemination to organs, peripheral nerves and feather follicles (151). Fully productive viral replication occurs only in feather follicle epithelium which, when sloughed off and disseminated with air currents, becomes the primary source of infectious viral particles to susceptible birds (3,4,6).

Currently there are three MDV vaccine strains commercially available worldwide: serotype 1 (GaHV-2) attenuated live vaccine (strain CVI988/Rispens), serotype 2 (GaHV-3) strain SB-1, and serotype 3 (MeHV-1) Herpesvirus of turkey (HVT); both serotypes 2 and 3 are considered non-virulent and generate an immune response which is protective against some serotype 1 field strains (183,190,261). Vaccination provides a life-long protective immunity against MD; specifically it generates an anti-tumor immune response which reduces mortality rates following infection with field strains, but does not protect against infection, replication, and/or virus dissemination (25,117,151). Although vaccine use decreases the presentation of clinical signs

associated with MD, the presence of field strains and subsequent immunosuppression observed predisposes chickens to secondary infection (e.g. Chicken Infectious Anemia virus) (259,262). It is believed that clinical signs of MD are associated with the emergence of new variants of MDV strains against which the vaccines are not fully protective (24,25). Based on the lesions, mortality rate and protection offered by the vaccine strains, GaHV-2 strains have been classified into four pathotypes: mild (m), virulent (v), very virulent (vv) and very virulent plus (vv+) (24,129). The vv+ MDV strains have been the predominant pathotype isolated (217) worldwide, for which vaccines do not appear to generate a very robust protection (25).

Serological techniques are not useful to evaluate the efficacy of vaccination or to establish the presence of different strains in poultry houses; therefore it is necessary to use other methods that allow for viral detection and quantification. Molecular tests allow detection of Mardiviruses in feather and blood samples, making it possible to distinguish between serotypes (190,259) and even suggest the pathotype of serotype 1 strains (97,156). Among these techniques the quantitative PCR (qPCR) is a highly sensitive test for absolute quantification of GaHV-2 (120), GaHV-3 (199) and MeHV-1 (127). Through this technique it is possible to measure the amount of viral genome per cell according to serotype (190). Other techniques like conventional PCR allow the detection of the three serotypes and determination of the pathotype (156).

MD is included as an economically important disease (old classification) in the OIE B list (24) and has a great impact on the poultry industry due to its economic losses. In Colombia, the official diagnosis method for MD is based on evaluating clinical signs and assessing histological findings. The Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) reports the number of MD cases on an annual basis. In 2012, the ICA reported an MDV infection in one farm resulting in 14.3% mortality rate. In spite of being a reportable disease, MD is not

considered in the category of official control diseases for chickens in Colombia. Therefore, although clinical cases of unconfirmed MD are reported in Colombia every year, the virus has not been studied or isolated from clinical cases presented in the country until now, and there is no molecular evidence of viral genome in poultry farms in Colombia. The main objective of this study was to investigate and characterize a virus related to a clinical case compatible with MD in a commercial layer farm from Colombia. The results presented here show the first molecular evidence of MDV, and the first viral isolation of a MDV field strain in Colombia.

7.4 Materials and methods

7.4.1 Sample collection.

Samples from organs (liver, spleen, sciatic nerves and blood) and feathers were collected from a suspected case of MD in an 18 week old flock of approximately 1000 Hy-line Brown layers, in a farm from Colombia. The farm had a previous history of clinical signs compatible with Marek's Disease and impaired condition, along with an increase in the mortality rate reaching 1.7% per week, with a final cumulative mortality rate of 37.7%. Economic losses due to poor performance and a decrease in the production parameters was evident for over a year. Previous analysis of macroscopic and microscopic lesions found in tissue samples suggested the presence of MDV. 1-day-old birds are routinely vaccinated with MeHV-1 strain *FC126* and GaHV-2 *Rispens* strain. Birds were euthanized by cervical dislocation (3) and macroscopic changes including splenomegaly, hepatomegaly and renomegaly, and sciatic nerve hemorrhages were observed during necropsy examination. Samples were collected from 9 healthy birds, and 8 birds showing clinical signs. Tissue samples from liver, spleen, sciatic nerve and thymus were taken in 5x5 mm pieces and fixed in 10% neutral buffered formalin. Spleens were frozen at -80° C for virus isolation, and

blood and feathers samples were taken from 17 birds for DNA extraction. The samples were conserved at -20° C until processing and analysis.

7.4.2 Histopathology and immunohistochemistry.

Samples were routinely processed and fixed in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin wax, sectioned (4 µm), and stained with hematoxylin and eosin. The slides were read and evaluated at PDRC, UGA, USA by light microscopy. (117).

For the immunohistochemistry analysis, paraffin tissue sections were deparaffinized in xylene, hydrated through graded alcohol, and then steamed for 1 hour in 1.0 mM EDTA solution (pH 8.4) at 60 °C. The sections were treated with 0.03% solution of H₂O₂ in PBS (phosphate buffered saline, pH 7.6) at room temperature for 5 minutes to block the endogenous peroxidase activity. An antibody against the MDV serotype-1 pp38 protein (Mouse monoclonal antibody H19.47, provided by Lucy Lee, USDA-ADOL) (23) was used to identify the acute cytolitic phase proteins of MDV. Sections were covered with PP38 antibody diluted at 1:250 and incubated in a humid chamber at room temperature for 30 minutes. The slides were incubated with secondary antibody Mouse/Rabbit UnoVue™ HRP/DAB (Diagnostic Biosystems. Cat # UMR 100PD) for 15 min. The peroxidase activity was developed with 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Dako. Liquid DAB + substrate Chromogen System. Ref K3468). The sections were counterstained with hematoxylin and then coverslipped.

7.4.3 DNA extraction.

Total DNA was extracted from blood samples using QIAamp® DNA Blood and tissue kit (QIAGEN, cat # 69506), according to the manufacturer's instructions with a final elution volume of 120 µL. Concentration of the extracted total DNA was determined by using a Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington).

7.4.4 PCR amplification of MDV genes.

Sets of specifically designed primers were used to amplify sequence specific to each of the MDV serotypes (Table 14). PCR conditions were optimized in a 50 µL reaction volume using 2,5 units of Taq polymerase (Invitrogen), 4 mM of MgCl₂, 400 mM of dNTPs, 1 mM of each primer and 10 ng of DNA. Amplification of MeHV-1 was performed using 30 cycles of 94 °C for 1.5 minutes, 60 °C for 1 minute, and 72 °C for 2 minutes. Amplification of GaHV-3 was performed using 35 cycles of 94 °C for 1,5 minutes, 55 °C for 1 minute, and 72 °C for 2 minutes, and for GaHV-2 the amplification was performed using 35 cycles of 94 °C for 1,5 minutes, 57 °C for 1 minute, and 72 °C for 2 minutes.

Tabla 14 Primers for PCR and rtPCR detection of the three MDV serotypes.

Target ¹	Sequence	Product size
GaHV-2 - <i>Meq gene</i> (PCR)	For: CCG CAC ACT GAT TCC TAG GC	1148 bp (RB1B)
	Rev: AGA AAC ATG GGG CAT AGA CG	1325 bp (Rispens)
BamHI-H and BamHI-D gene (16) (PCR).	For: TACTTCCTATATAGATTGAGACGT	434-bp and 566-bp.
	Rev: GAGATCCTCGTAAGGTGTAATATA	
GaHV-3: <i>gD gene</i> (PCR).	For: TTCTTCGGACACCTTTTCGCCT	1040 bp
	Rev: TTCCTGGACGGGCGTTGAGGT	
MeHV-1: <i>Sorf 1 gene</i> (19) (PCR).	For: AAGCGCTTGATGTGTAGG	350 pb
	Rev: TATGGACGTCATGCAGTTGG-3	
GaHV-2 <i>Meq gene</i> (qPCR) (22,23).	For: GGT CTG GTG GTT TCC AGG TGA	73 bp
	Rev: GCA TAG ACG ATG TGC TGC TGA	
	Probe: AGA CCC TGA TGA TCC GCA TTG CGA CT (5' FAM, 3' BHQ1)	
GaHV-3 DNA <i>pol gene</i> (qPCR).	For: AGC ATG CGG GAA GAA AAG AG	100 bp
	Rev: GAA AGG TTT TCC GCT CCC ATA	
	Probe: CGC CCG TAA TGC ACC CGT GAC T	
MeHV-3 <i>sORF1 gene</i> (qPCR).	For: GGC AGA CAC CGC GTT GTA T	77 pb
	Rev: TGT CCA CGC TCG AGA CTA TCC	
	Probe: AAC CCG GGC TTG TGG ACG TCT TTC	
<i>Chicken ovo transferrin Gene</i> (24). qPCR	For: CAC TGC CAC TGG GCT CTG T	71 pb
	Rev: GCA ATG GCA ATA AAC CTC CAA	
	Probe: AGT CTG GAG AAG TCT GTG CAG CCT CCA (5'Yakima Yellow, 3'TAMRA)	

For: Forward. Rev: Reverse. ¹Target gene.

7.4.5 Analysis of pathotype by PCR.

The nucleotide sequence of the BamHI-H and BamHI-D regions of the virus genome was used to differentiate pathogenic strains from non-pathogenic isolates in GaHV-2, this segment flanks the 132 bp tandem repeat region in the viral genome (156). The primers used are listed in Table 14. The Forward primer is located in the region 65 bp upstream of the 132 bp repeats, and the reverse primer is located 105 bp downstream of the region. When there are only two 132-bp repeats these primers amplify a segment of 434 bp. The most pathogenic strains have only one or two repeats of the 132 bp band, while the mild strains have between 6 and 7 repetitions. The monomer band is more intense than the other bands, so it is more easily seen (216). PCR conditions were similar to those used in the above, using 35 cycles of 94 °C for 1,5 minutes, 55°C for 1 minute, and 72°C for 2 minutes (16,22).

The PCR products were separated on a 1% agarose gel prepared with TAE 1X (40 mM Tris, acetic acid, 2 mM EDTA) buffer and stained with ethidium bromide (1 mg/mL). The gel was run at 70 V for 1 hour and the bands were visualized in a UV trans-illuminator and analyzed using the Gel Capture Image Acquisition Software (Bio Imaging Systems).

7.4.6 Sequencing and phylogenetic analysis.

The *Meq* gene PCR products were purified directly from the gel using the QIAquick Gel Extraction Kit following the manufacturer's recommendations (cat # 28704) (20). In samples with two PCR products (two different bands in the electrophoresis), the bands were cut and processed separately. The purified products, were stored at 4°C until required for sequencing. Sequencing oligonucleotides were designed to amplify the full length *Meq* gene, using PyroMark Assay Design Software 2.0 (Qiagen) (Table 14).

Sequence data were assembled and edited over a total length of 1020 bp using the SeqMan program (DNA Star Laser gene software package, Madison, WI, USA). DNA sequence accession numbers for *Meq*-encoding genes are summarized in table 4. Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) was used to explore sequence similarity of Marek's disease virus strain *UdeA-2013CO* strain (name given to the clinical isolate. Genbank: KU058696) to some of the available sequences of *Meq* in the NCBI nucleotide databases. Nucleotide and deduced amino acid alignments of the 25 full-length *Meq* gene sequences, along with strain *UdeA-2013CO* isolated from the present clinical case and several vaccine strains, were performed with MEGA 6 using the Muscle algorithm, and uncorrected (p) distances for nucleotide and amino acid sequences were calculated.

A phylogenetic tree was generated using the neighbor-joining (N-J) method, and the liability of internal branches was assessed by 1000 replicates. The MDV reference sequences were retrieved from the Gen Bank database, and their accession numbers are listed in Table 17.

7.4.7 Real - Time PCR.

Real-time quantitative PCR (qPCR) was used for absolute quantification of viral genomes (120). Oligonucleotides and probes designed specifically for *Meq* gene (GaHV-2), *DNA pol* gene (GaHV-3) and *sORF1* gene (MeHV-1), were used in the reaction, Table 1 (190). qPCR was performed in 96-well plates (FAST Optical 96-well PCR plates # 4346906 Applied Biosystems) in a final volume of 25 μ L per well, containing 1X Master Mix (Absolute Blue low ROX qPCR mix, Fisher, # AB4318), $MgCl_2$ (1 mM), dATP, dCTP, dGTP and dUTP (0,2 mM each), Taq DNA polymerase (0,65 U) and Uracil N-glycosylase (0,25 U); Primers 0,4 μ M each, 0,2 μ M virus probe (5-carboxyfluorescein (FAM) - fluorescent-tagged probe from Sigma-Genosys Ltd.), 0,2 μ M probe *Chicken Ovotransferrin Gene* (OT) (Yakima Yellow-fluorescent-tagged probe from

Eurogentec), 10 µg BSA (Bovine serum albumin, Sigma # A7030, 1,6 mg/mL) and 4 µL of DNA (10 ng/ul). An ABI PRISM® 7500 instrument (Applied Biosystems) was used to amplify and detect the reaction products, using the following conditions: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 94°C for 15 seconds and 60°C for 1 min (120).

Chicken embryo fibroblasts (CEF) were used to prepare the standard DNA for the qPCR. CEF single-cell suspension was prepared from 10-day old chicken embryos, and cells were seeded in four T75 flasks at a density of 8×10^5 cells. At 80% confluency CEF cultures were infected with vaccine virus belonging to one of the three serotypes (MeHV-1, GaHV-3, or GaHV-2) and control (mock inoculation). When the cytopathic effect was evident, cells were harvested and DNA was extracted using a commercial kit following the manufacturer's recommendations (DNeasy Blood & Tissue Kit. Qiagen cat # 69504). DNA samples were quantified using a Nanodrop and samples were subsequently used to set up serial dilutions (10^{-1} to 10^{-7}) to generate standard curves in qPCR, allowing calculation of the MDV genome copy number. Data were analyzed using Microsoft Excel® according to Baigent et al., 2005 (120).

7.4.8 Virus Isolation.

Spleens of the affected birds preserved at -80°C, were processed as follows. A half portion of the spleen was stored at -20°C for DNA extraction. The remainder was finely minced with a blade and suspended in 5 ml of DMEM (Powder, high glucose, GIBCO, Cat number: 12100-046) supplemented with 2% antibiotic-antimycotic solution (Antibiotic-Antimycotic 100X, GIBCO. Cat number: 15240-062). The cell suspension in DMEM + 2% antibiotic-antimycotic solution was macerated and passed through a 40 µm cell sieve using a 10 ml syringe and collected into a 50 ml Falcon tube. The cell

suspension was layered onto a Ficoll gradient (Ficoll Paque Premium, GE Health Care) and centrifuged at 450 x g for 15 minutes at 4°C. The white buffy coat was aspirated and washed at 1500 rpm for 5 min. The lymphocytes isolated subsequently were inoculated in primary CEF cultures that were 80% confluent, one of the cultures was a negative control sham infected (0.5 ml DMEM). Infection dose was 6 x 10⁶ spleen lymphocytes per well, 3 x 10⁶ spleen lymphocytes per well and 1 x 10⁶ spleen lymphocytes per well (6-well plate). This allowed the evaluation of different dilutions of the virus. The inoculated cells were incubated at 37°C in an atmosphere with 5% CO₂ and observed daily using an inverted light microscope (Olympus CKX31) for evidence of the cytopathic effect (CPE). Once the CPE was observed, DNA was prepared from the cells, and PCR was performed for GaHV-2 to confirm the presence of the virus.

7.5 Results

7.5.1 The histological lesions are compatible with Marek's Disease.

A diffuse mononuclear infiltrate in the sciatic nerve was observed in birds with clinical signs of MD (Table 15) (116).

The infiltrate was interspersed with areas of edema and degeneration of fibers that is compatible with a highly virulent strain of MDV (Image 9). Severe cortical thymus depletion reflected a state of immunosuppression. The apparently normal birds had mild lymphoid infiltration in the sciatic nerve, which is considered a sign of MD but, because of its low grade, it does not generate neurological signs or paralysis of the legs (117). In the spleen and thymus no significant changes were evident.

Tabla 15. Histological findings in birds with clinical signs of Marek's Disease.

Bird ¹	Organ	Findings ²
001	Sciatic nerve	Diffuse lymphocytic neuritis, vasculitis, associated with paralytic changes. Abundant heterophils.
002	Sciatic nerve	Multifocal mononuclear infiltration and edema.
003	Sciatic nerve	Diffuse and multifocal mononuclear infiltration
004	Sciatic nerve	Diffuse lymphocytic neuritis
	Thymus	Severe cortical depletion, lymphoid atrophy.
	Sciatic nerve	Multifocal lymphocytosis.
005	Liver	Dilated bile duct.
006	Sciatic nerve	Multifocal lymphoid aggregates
007	Sciatic nerve	Diffuse lymphocytic infiltrate
008	Sciatic nerve	Diffuse and severe neuritis
009	Sciatic nerve	Mild neuritis.

¹ Identification number of the samples. ² Description of the lesions found in the histological analysis.

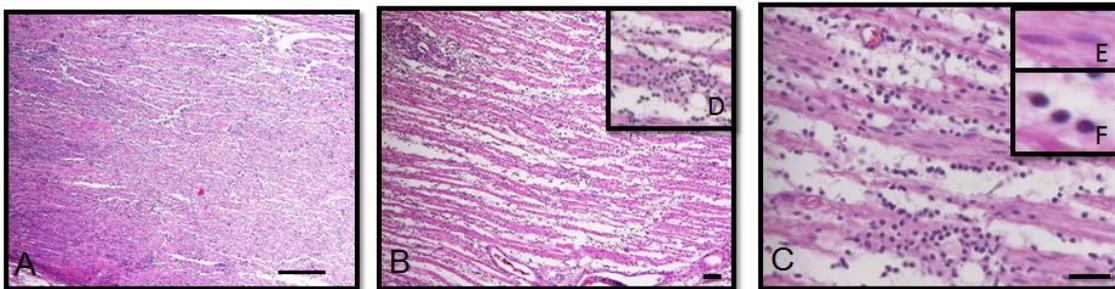


Image 9. Lymphoid infiltrate in sciatic nerve of a bird with clinical signs of MDV in different magnification. HyE stain. A. Sciatic nerve. Severe and diffuse mononuclear infiltrate was observed. Lymphocytes (F) are seen as basophilic cells with large round nucleus. Nerve fibers stained eosinophilic. 40X magnification. Scale bar 100 μ m B. Sciatic nerve. Severe diffuse mononuclear infiltrate was observed. Edema areas between nerve fibers (D). 100X magnification. C. Sciatic nerve. Severe and diffuse mononuclear infiltrates. Basophile nucleus characteristic of monocytes (F) was observed. Those were located between nerve fibers. Schwann cell nucleus (E). 400X Magnification. Scale bar 50 μ m.

Immunohistochemistry with the antibody pp38 showed positive staining in the cytoplasm of mononuclear cells (lymphocytes and macrophages), as would be expected during the cytolytic phase due to the expression of the phosphoprotein in these cells. This was indicative of active infection with Marek's Disease virus (Image 10) (117).

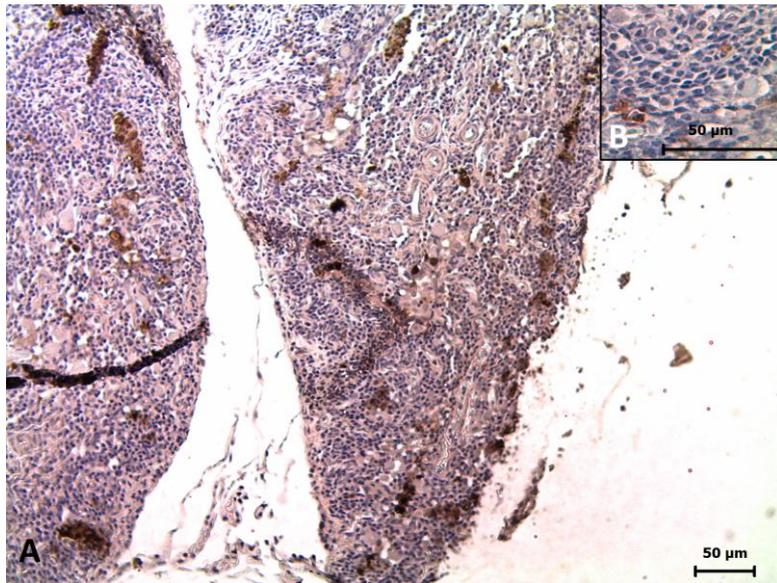


Image 10. A. Section of thymus from a laying hen with clinical signs of MDV from Colombia. Immunohistochemistry with PP38 antibody in formalin fixed tissue. Antibody binding (B) in macrophages and lymphocytes with some background staining observed in fibrous tissue. 20x magnification. Scale bar 100 µm.

7.5.2 Genomic amplification of the 3 serotypes of MDV.

The standard PCR for the *Meq* gene (serotype 1, Figure 3 A) resulted in six positive samples (31.57%), which were purified for subsequent sequencing. Only two samples were positive for glycoprotein D (*gD*) gene PCR (GaHV-3). All samples were positive for MeHV-1 (data not shown).

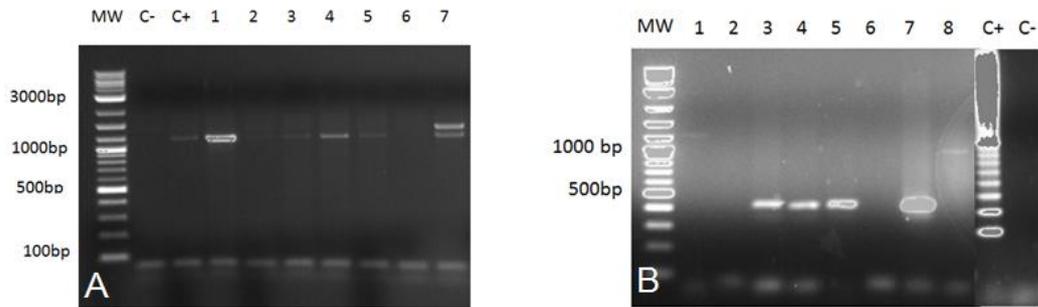


Image 11. PCR amplification of the *Meq* gene from MDV clinical case of this study. A. Expected band: 1148 (*RB1B* strain) or 1325 (*CV1988* strain). MW: Molecular weight marker 100 bp. C-: negative control (PCR reaction mix with water). C +: Positive control (CEF infected with *RB1B* strain). DNA Blood samples in lines 1 to 7. Sample with two bands corresponding to strains with long *Meq* Gene copy was observed (An insertion of 59 amino acids in the proline-rich region), which is consistent with low virulent strains (2). Samples that have only one band lack this insertion and are associated with increased virulence; 6 samples exhibit a single band. B. PCR products of the 132 bp repeat segment. Positive Control: *Rispens* strain (8 bands). DNA Blood samples in lines 2 to 8. Image was taken using an UV transilluminator with GelCapture Acquisition Software.

A total of 94.7% (18/19) samples tested positive for GaHV-2 by qPCR, with an average of 567 copies of viral genome per 10.000 cells (minimum 0.33 copies, maximum 45953 copies). The GaHV-3 qPCR detected 2.3 copies per 10,000 cells in 94,7% of the samples. All samples were positive for MeHV-1 qPCR, with an average of 47.79 copies (Table 16).

Table 3 shows comparative results between PCR and qPCR for each serotype, demonstrating the high sensitivity of the qPCR to detect the virus.

Tabla 16 Comparative results between standard PCR and rtPCR.

Sample	GaHV-2 ¹			GaHV-3 ²		MeHV-1 ³		
	<i>MDV-1 qPCR</i>	<i>PCR Meq</i>	<i>PCR 132 pb</i>	<i>PCR PP38</i>	<i>MDV-2 qPCR</i>	<i>PCR gD</i>	<i>qPCR HVT</i>	<i>PCR HVT</i>
SJA9	126,01	Negative	Positive	Negative	5,81	Negative	139,81	Positive
SJA5	12,95	Positive	Negative	Negative	0,55	Negative	8,69	Positive
SJA2	23,66	Negative	Positive	Negative	0,19	Negative	66,08	Positive
SJ15S	0,33	Negative	Positive	Negative	0,09	Negative	1,10	Positive
SJA4	2,88	Negative	Positive	Negative	1,99	Negative	8,60	Positive
SJ14S	6,27	Negative	Negative	Negative	0,72	Negative	6,98	Positive
SJA6	21,53	Negative	Negative	Negative	1,05	Negative	23,12	Positive
SJ11S	3,67	Positive	Negative	Negative	1,10	Negative	4,78	Positive
SJA8	4,81	Negative	Negative	Negative	2,43	Negative	22,02	Positive
SJA3	39,76	Negative	Negative	Negative	10,75	Negative	116,77	Positive
SJ17S	9,14	Positive	Positive	Negative	0,29	Negative	18,85	Positive
SJ10S	16,56	Negative	Positive	Negative	1,66	Negative	27,69	Positive
SJA7	19,39	Negative	Negative	Negative	1,02	Negative	23,69	Positive
SJ12S	1,30	Negative	Positive	Negative	1,58	Negative	2,03	Positive
SJ16S	54,56	Negative	Positive	Negative	6,22	Negative	65,11	Positive
SJ13S	9,87	Positive	Negative	Negative	2,02	Positive	4,15	Positive
SJH1	45953,06	Negative	Positive	Negative	10627,37	Negative	929006,69	Positive
SJH2	1707,44	Positive	Positive	Positive	255,54	Positive	37,39	Positive
SJA1	253,20	Positive	Negative	Negative	0,17	Negative	236,70	Positive

The table shows the results of Real – Time PCR expressed in genome copies of MDV per 10,000 cells and the PCR. ¹ MDV Serotype 1 detection . ² MDV Serotype 2 detection. ³MDV Serotype 3 detection . ⁴ PCR for Meq gene

7.5.3 The GaHV-2 strain is highly virulent according to its repeating pattern of 132 bp.

A total of 10 blood samples (59%) from birds with clinical signs of MD were positive for the BamH1-H – BamH1-D 132-bp PCR, 8 of these showed only 1 band, which is associated with high pathogenicity (Figure 3 B). Two samples showed a 1000 bp band that might be associated with less pathogenic strains. This result suggests that there is more than one strain affecting the flock but that the highly virulent strain predominates (156,200).

7.5.4 *Meq* gene mutations confirm the presence of a highly virulent strain (vv+MDV).

The deduced amino acid sequence of the *Meq* gene for UdeA-2013CO strain (339 aa) was aligned with high and low virulence strains isolated in different geographical regions and several vaccine strains (Table 17). UdeA-2013CO strain, isolated from the clinical case reported in the farm, has point mutations in the proline-rich region: P176A, P217A and P233L. These exchanges in the second position of proline (PXPP) are associated directly with highly virulent strains. Unique substitutions in P233L and L258S were detected in UdeA-2013CO strain; these specific mutations have not been reported so far in any strain isolated in other geographical regions. It was found, by BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>), that the UdeA-2013CO strain had 99% identity with strains isolated in China during 2006-2008 (263) (LDH: [HQ658614.1](#); G2: [AF493556.1](#); LHC4: [HQ658618.1](#)). The UdeA-2013CO strain has also a substitution E77K, which has been associated with strains of low virulence (263).

Tabla 17. Amino acid substitution in the *Meq* protein of GaHV-2 strains.

Identification			Amino acid position in the <i>Meq</i> protein of MDV														
Strain	Pathotype	Code ²	71	77	80	93	115	119	153	176	180	217/276 ¹	233	258	277/336	283/342	320/379
UdeA-2013CO	Vv+MDV		A ³	E	Y	Q	A	C	P	A	A	A	<u>L</u>	<u>S</u>	L	A	I
cu-2	mMDV	AY362708	S	E	D	Q	V	C	P	P	T	P	P	L	L	A	I
567	vMDV	AY362709	A	E	Y	Q	V	R	P	P	T	A	P	L	L	A	I
571	vMDV	AY362710	A	E	Y	Q	A	C	P	H	T	P	P	L	L	A	I
573	vMDV	AY362711	A	E	Y	Q	A	C	P	H	T	P	P	L	L	A	I
617 ^a	vMDV	AY262712	A	E	Y	Q	V	R	P	P	T	A	P	L	L	A	I
JM	vMDV	AY243331	S	A	D	R	A	C	P	P	T	P	P	L	L	A	I
660 ^a	vv+MDV	AY362726	A	K	D	Q	V	R	Q	A	A	A	P	L	P	A	I
686	vv+MDV	AY362727	A	K	D	Q	V	R	Q	A	A	A	P	L	P	A	I
NEW	vv+MDV	AY362719	A	K	D	Q	V	R	Q	A	T	A	P	L	L	V	T
RL	vv+MDV	AY362720	A	K	D	Q	V	R	Q	A	A	A	P	L	L	A	I
TK	vv+MDV	AY362721	A	K	D	Q	V	R	Q	A	A	A	P	L	L	A	I
U	vv+MDV	AY362722	A	K	D	Q	V	R	Q	A	A	A	P	L	P	A	I
W	vv+MDV	AY362723	A	K	D	Q	V	C	P	P	T	A	P	L	L	V	T
X	vv+MDV	AY362724	A	K	D	Q	V	R	Q	A	A	A	P	L	L	A	I
643p	vvMDV	AY362716	A	K	D	Q	V	R	Q	A	A	A	P	L	F	A	I
RB1B	vvMDV	AY243332	A	K	D	Q	V	C	P	P	T	P	P	L	L	A	I

Amino acid position in the *Meq* Protein. The unique changes of the UdeA-2013CO Strain are showing in red ¹Position according to the isoform: long or short *Meq* gene. ² Accession number in the NCBI. ³ Amino acid's code.

7.5.5 The UdeA-2013CO strain was clustered with vv+ MDV strains.

The phylogenetic relationships, based on the alignment of *Meq* gene sequences inferred by the neighbor joining method, identified four monophyletic clusters: Group I including Chinese isolates, Group II comprising Australian isolates, Group IV including attenuated strains and Group III encompassing virulent, very virulent and hypervirulent strains. The UdeA-2013CO strain, clustered with hypervirulent strains within Group III (image 12).

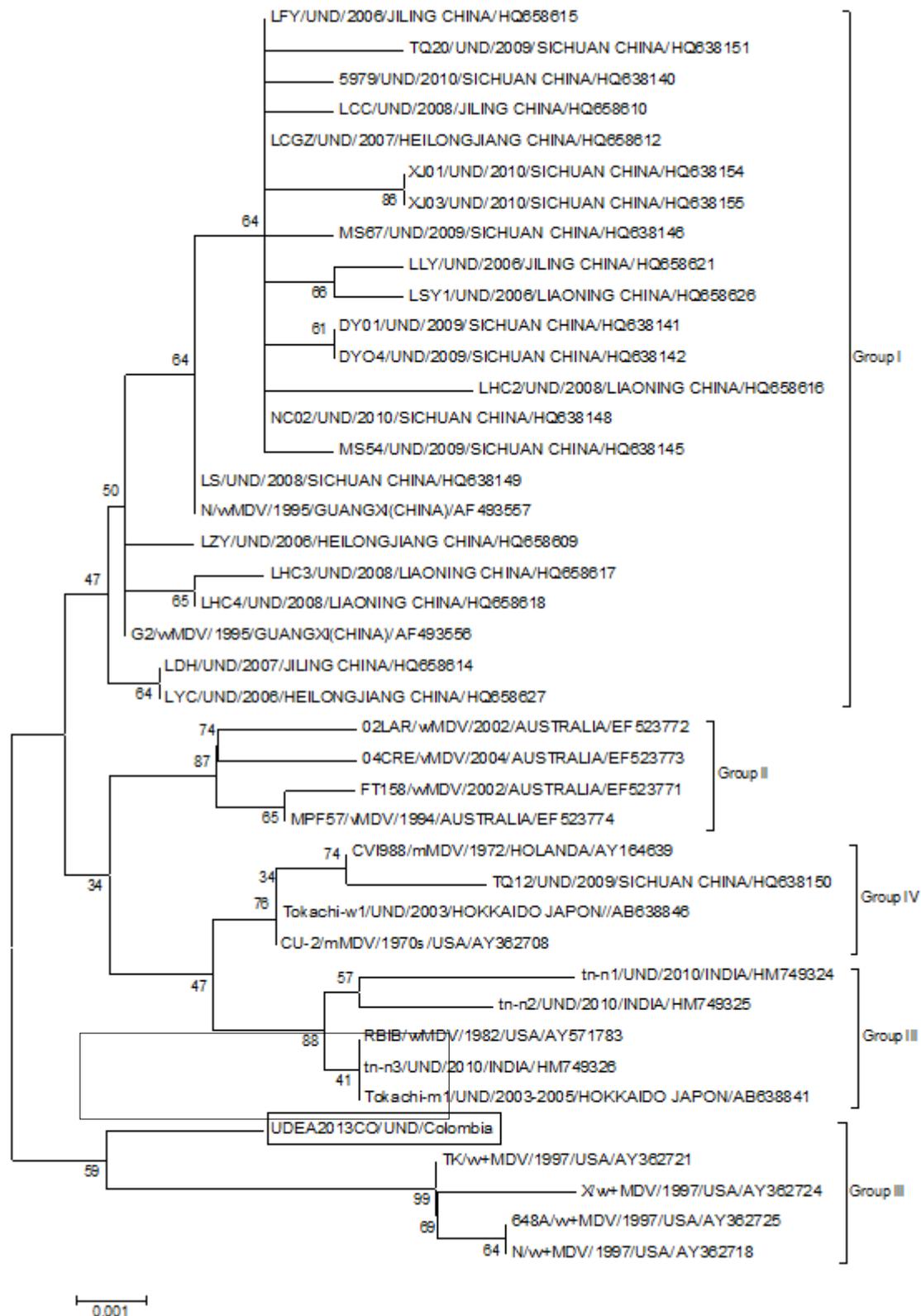


Image 12. Phylogenetic relationships between 41 GaHV-2 strains based on *Meq* gene sequences. The phylogenetic tree was inferred by the Neighbor Joining Method. Strain name, pathotype, year of isolation, country of origin and GenBank accession numbers are indicated in

the tip labels. Numbers at the nodes are bootstrap values for the clade. UND: undetermined pathotype. The analysis was performed in MEGA 6

7.5.6 The cytopathic effect in cell culture is characteristic of MDV GaHV-2.

Formation of plaques in the monolayer with the presence of large round cells was observed 5 days post inoculation in all 9 wells inoculated with the 6×10^6 and 3×10^6 lymphocytes, those plaques are characteristic of *Herpesvirus* (Image 13). PCR was performed for the *Meq* gene to confirm the presence of the genome of the GaHV-2 in the harvested cells, with a positive PCR result for all samples showing CPE (data not shown).

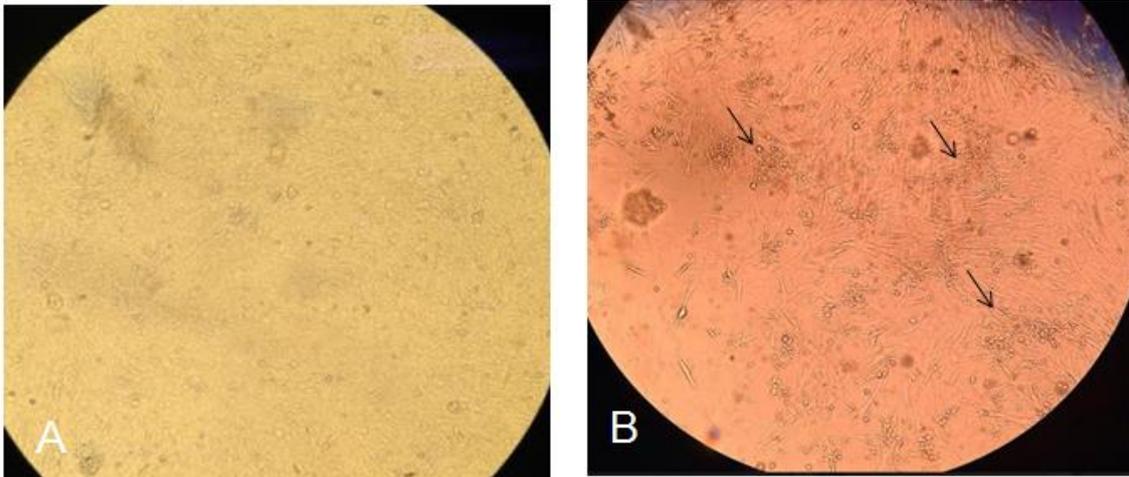


Image 13. Virus isolation in chicken embryo fibroblast. A. Mock. Intact monolayer. Confluent cells. B. Cells inoculated with 6×10^6 spleen lymphocytes 5 days pi. There are some plaques characteristics of serotype 1. The photos were taken in inverted microscope. 100X magnification.

7.6 Discussion

Despite the Colombian hatcheries implementing an intensive vaccination program against MDV with the use of CVI988/RISPENS + HVT in 1-day old chickens, poultry flocks still succumb to infection, with sporadic reported cases of Marek's disease like symptoms(12,263–265). MD is an oncogenic disease that infects predominantly chickens and is estimated to cost \$1-2 billion

annually to the poultry industry worldwide (184). It may be one of the most severe viral diseases that is currently affecting the Colombian Poultry production system. In this report, we present data demonstrating the isolation and characterization of a very virulent strain of Marek's disease virus for the first time in Colombia.

The analysis of macroscopic and microscopic lesions found in the tissue samples (thymus and sciatic nerves) suggested the presence of MD (13,24). In the classical form of the disease, the nerves are mainly affected, and mortality rates within a flock rarely exceeds 10–15% (172). In this case, the mortality reached over 30% in 50 weeks, with no visible lesions or gross visceral lymphomas. These findings suggest that the birds presented the classical form of MD probably with secondary infections, which can explain the increase in the mortality (4,7,9). MDV outbreaks reported worldwide present more commonly with acute clinical forms of MD, whereby extensive visceral lymphomas, severe depression and sudden death occur (23,172).

The immunohistochemical staining for the MDV pp38 protein in the thymus showed abundant pp38 antigen, confirming the presence of MDV within the lesions (266). According to Singh *et al.*, 2012 (168), this protein is expressed in all tumor stages of the disease, but Gimeno *et al.*, 2005 (267), observed this antigen widely during the cytolytic phase, where the processes of atrophy and lymphoid depletion occur and can be explained by the reactivation some of lymphoid cells in latent phase. In spite of the fact that virus antigens were not detected by IHC, a cellular infiltration in nerves was detected in all the samples. According to Lawn, 1979 (268), inflammatory changes in nerves are observed as early as 5 days after infection, and can be present until the latent phase of the disease. However no virus particles can be found in nerves at any time, which supports our findings in the IHC. The infiltration in nerves also correspond

to lesions compatible with MD as described in other studies (13,23,117,145,244).

The presences of MDV DNA in the whole blood samples were also demonstrated. The positive results that demonstrate the presence of MeHV-1 and GaHV-2 by PCR can be explained due to the use of recombinant vaccine (HVT + IBD and *Rispens*) administered at the hatchery by the subcutaneous route in 1 day old chicks. There were some positive samples for GaHV-3, which corresponds to a natural infection with a non-virulent field strain. However, the qPCR revealed high amounts of GaHV-2 in some samples of affected birds. The GaHV-2 vaccine strain genome is quantifiable by qPCR in immune organs as early as 7 days post infection, peaks by 28 dpi, but then gradually decreases by 40 dpi, while the vvMDV strain can still be detected in peripheral blood and tissues by 90 dpi and can cause tissue destruction, resulting in immunosuppression (176). We found as much as 45.953 copies of viral GaHV-2 genome per 10000 cells, which is higher than expected in that age (<1000 copies) (120,190). It has been found that the number of copies of the genome is low during the first days after infection, but rapidly increases at 14 days and reaches its peak at 28 days (127), which explains why there were some birds with low levels of GaHV -2, since the infection could be in the cytolytic phase (approximately 7 dpi). Additionally the *Rispens* vaccine strain significantly reduce the viral load of vv+ MDV in blood (215). Co-infection with other MDV strains has been demonstrated and suggests that short-interval challenge exposure and weak initial exposures may be important factors leading to infection (185,269). There are also reports of an interaction between pathogenic and vaccine viruses (215). Additionally, the BamHI-H PCR amplified a 434 bp fragment (two 132 bp repeats), in 8 of 10 clinical samples indicating the presence of virulent oncogenic MDV. The *Rispens* vaccine strain and non-pathogenic strains have many copies of the 132 bp repeats and shows 6 to 8

bands. Based on the results found in this study it could be suggested that an increase in the virulence of the field virus is involved in the present outbreak (156,270).

Furthermore, it is thought that the increase in clinical MD cases from vaccinated birds is attributed to an increased virulence of MDV strains (24,25). Birds vaccinated with serotype 3 (MeHV-1) strains usually show clinical signs attributed to vvMDV infection, while birds vaccinated with serotype 1 and 3 (GaHV-2 and MeHV-1) are susceptible to vv+MDV strains (2,25); this is in agreement with our finding of a vv+MDV strain, that was isolated from birds that had been vaccinated with serotype 1 (GaHV-2) and 3 (MeHV-1) at day 1 of age. It is not clear why virulent pathotypes are able to break vaccine immunity (25). GaHV-2 can cause disease in vaccinated chickens due to lowered protection or reduced vaccine virus viability before the administration (inappropriate storage, handling and administration) (150); even in well vaccinated chicks, the very virulent strains of MDV could break through the protection provided by MeHV-1 and GaHV-2 vaccine immunization due to an immune failure caused by co-infections with other pathogens like Chicken Infectious Anemia virus, Reovirus and Infectious Bursal Disease Virus (230,271–273). Furthermore, viral evolution or vaccine escape has been associated with the use of a multitude of vaccines especially in situations whereby sterile immunity is not achieved (144). In Colombia, the presence of MD in poultry flocks can be explained with the emergence of a new virulent MDV strains (144), compounded with vaccine mishandling and imperfect vaccination (274), or co-infection with immunosuppressive agents (108,275). Nevertheless, the authors believe that is the first report and demonstrate, with the use of molecular characterization techniques, the presence of MDV in Colombian layer flocks and furthermore, viral evolution that could lead to vaccine escape.

Because of this, blood samples were also screened by PCR amplification of the *Meq* full-length gene. It has been described that oncogenic GaHV-2 strains possess a unique basic protein called Meq (MDV EcoRI Q) encoded by the internal repeat long and terminal repeat long regions (named IRL and TRL respectively) (205); also it has been shown that point mutations and polymorphisms in this protein are directly associated with virulence (163,174). During the GaHV-2 infection, Meq protein is expressed in the transformed cells, and is also associated with the latent phase. This leucine zipper protein (b-ZIP) is located in the nucleus and nucleolus of infected cells; it blocks apoptosis, induces proliferation and activates suppression type genes, these functions being located in the Meq protein amino terminal region in a long block of repeats of proline among the amino acid residues 146 and 252 (205,276). Exchanges in this region are associated with pathotype: thus low virulence strains have proline repeat regions (PPPP), whereas virulent strains present a single exchange in the second amino acid from proline rich region (PA/Q PPP) (174). The novel mutations that were found in three sites (176, 217: A and 253: L) of *Meq* gene of UdeA-2013CO, might suggest that this is a highly virulent strain, although we did not find any changes at the position 153 that has been reported by other authors in the very virulent strains (174). The finding of a unique amino acid exchange in two positions of the *Meq* gene from the field virus circulating in this farm identify this as a different strain, similar to the situation in countries such as China (277), where they have identified strains with different characteristics in vaccinated birds (217). It is important to assess whether this virus represents a new strain and if these results confirm a continuing evolutionary shift of MDVs to greater virulence (12).

The causal agent of this outbreak was also confirmed by the virus isolation in CEF. The cell cultures infected with splenic cells of sick birds showed CPE in the monolayer compatible with MDV plaques (24,278,279) and was further

confirmed by PCR of the harvested cells. Although CKC or DEF are recommended for MDV isolation (172), CEF are also used and shows the same CPE like the other cultures, although the effect is observed later (5-6 days after inoculation) (275,278–280). The UdeA-2013CO strain, isolated in the clinical case reported in a commercial farm, clustered within group III and is genetically closely related to hypervirulent strains suggesting that it could behave as the hypervirulent strains based on the phylogenetic analysis of *Meq* gene sequences. The inclusion of strain UdeA-2013CO split Group III in two monophyletic clusters, one of them with a bootstrap support value of 89% comprising virulent and very virulent strains and the second with a bootstrap value of 59% encompassing hypervirulent strains and the UdeA-2013CO Colombian strain. The sequence of the sample allowed the authors to establish that the outbreak was due to vv+ MDV (270). The virus contains changes in the *Meq* protein very characteristic of pathogenic MDV and, together with the presence of lesions in sciatic nerves, presence of genome of MDV, the quantity of the virus in the samples and the previous history of mortality and vaccination confirm the infection.

In conclusion, we demonstrated the presence and quantified the three serotypes of MDV in the samples from birds with clinical signs in the Andean region from Colombia. Furthermore, the presence of viral protein pp38 was demonstrated in tissues and the histological lesions were consistent with Marek's disease. Additionally we confirmed that the clinical case was the result of an infection with a highly virulent serotype 1 strain (vv+ MDV) because of the predicted amino acid sequence analysis of *Meq* protein and phylogenetic analysis of the strain. This study shows the results of the first molecular analysis of MDV, and the first report of vv+ MDV field strain in Colombia suggesting that these highly virulent strains of the virus are circulating in the country and could be easily spreading by environmental conditions and biosecurity failures. The

results highlight the importance of determining the risk factors for virulence evolution of MDV and consequently to develop control strategies which will prevent the emergence of virulent strains (144). Application of the qPCR for MDV diagnostic in Colombia could significantly increase our understanding of the epidemiology, spread, diagnosis and vaccine control of MD in our country. The identification of the pathotypes is also necessary to establish the standards in the biosecurity of the farms, and design control programs, like re-vaccination and monitoring the levels of the virus spread during the critical age. Future research should focus on verifying if the vaccines are effective against this vv+ MDV strain.

8. Conclusiones generales.

Se puede afirmar que el MDV y el CIAV se encuentran circulando en las aves de levante de algunas granjas del norte y oriente de Antioquia, y que hay evidencia por histopatología de inmunosupresión que pueden estar relacionada con la co-infección por estos virus.

En el caso del MDV se encontró que la dinámica de positividad por PCR para el serotipo 3 durante el levante, es característica de una cepa vacunal, mientras que el serotipo 1 y 2 presentan un comportamiento asociado a infección de campo. El patrón de bandas en la PCR indica que hay diferentes cepas circulando en las granjas, tanto de carácter atenuado virulento, y que circulan junto con el virus vacunal, por lo que probablemente no causan enfermedad pero si permite la evolución del virus hacia patotipos más virulentos.

El hecho de encontrar que los 3 serotipos del MDV, tanto de patotipos atenuados como virulentos, circulan en las granjas durante el levante, además del CIAV, es una alarma para los productores, ya que indica que las aves están siendo expuestas a ambos virus posiblemente por fallas en los sistemas de bioseguridad, ya sea en granja o en incubadora, haciendo que el virus infecte y recircule, dándole la oportunidad de generar daños en el sistema inmune que y probablemente generando fallas en la vacunación.

Las aves de traspatio resultaron positivas para ambos virus, en cantidades elevadas, constituyendo un riesgo para las granjas comerciales, ya que actúan como reservorio del virus de campo, y permiten su distribución en otras zonas ya que están en contacto con aves silvestres las cuales pueden transportar las partículas virales. Con las técnicas para el diagnóstico estos agentes normalizadas, es posible hacer un monitoreo de la vacunación y determinar la cantidad del virus vacunal y no vacunal presente en el ambiente, y de esta

manera realizar seguimiento a la vacunación, verificar serotipos presentes en la granja y evaluar una posible coinfección con virus de campo.

Se hace necesario realizar más estudios de caracterización molecular y se sugiere mejorar en las prácticas de vacunación, siempre basados en la evidencia del agente, y optimizar las medidas de bioseguridad que no permitan entrada ni salida de patógenos de las granjas. Además, es conveniente buscar vacunas de tecnología recombinante o DNA que no permitan que el virus se convierta en patotipos más virulentos, como lo ha venido haciendo los últimos 40 años.

Ya que no es factible la erradicación de estos virus, debemos buscar un equilibrio enzoótico, con el uso moderado de biológicos y buenas prácticas de manejo, así como un diagnóstico adecuado, que genere información de carácter epidemiológico por zonas para ayudar a diseñar los planes de vacunación.

9. References

1. FENAVI. Estadísticas FENAVI. [Internet]. Bogotá; 2013. Available from: <http://www.fenavi.org>
2. FENAVI. Fenavi estrena índice de confianza. Rev Avic [Internet]. 2013;206. Available from: <http://www.fenavi.org/images/stories/revistaavicultores/libros/revista-206/>
3. Bagust TJ. Salud de las aves de corral y control de enfermedades en los países en desarrollo. revisión del desarrollo avícola [Internet]. Melbourne, Australia; 2008; Available from: <http://www.fao.org/docrep/016/al729s/al729s00.pdf>
4. Hoerr FJ. Clinical Aspects of Immunosuppression in Poultry. Avian Dis. 54(1):2–15.
5. ICA. Sistema de Información y Vigilancia Epidemiológica. COLOMBIA, SANIDAD ANIMAL INFORME TÉCNICO 2008. Bogotá; 2009.
6. Calderón Barrantes G. Aveagro Inmunosupresión en aves. [Internet]. Actualidad avipecuaria. Lima Perú. 2010. Available from: <http://www.actualidadavipecuaria.com/articulos/inmunosupresion-en-aves>
7. Karel A S, Michael A S. Avian Immunosuppressive diseases and immune evasion. In: Avian Immunology. Elsevier. Páginas; 2008. p. 299–322.
8. Drén C, Farkas T, Németh I. Serological survey on the prevalence of chicken anaemia virus infection in Hungarian chicken flocks. Vet Microbiol [Internet]. 1996 May [cited 2015 Feb 25];50(1-2):7–16. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378113596000028>
9. A MM, S MR, R WM. Coinfection of specific-pathogen-free chickens with Marek's disease virus (MDV) and chicken infectious anemia virus: effect of MDV pathotype. Avian Dis. United States; 2001;45(1):9–18.
10. Haridy M, Sasaki J, Okada K, Goryo M. Persistence of inclusions and antigens of chicken anemia virus in Marek's disease lymphoma. Res Vet

Sci [Internet]. 2012 Dec [cited 2015 Apr 19];93(3):1353–60. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003452881200135X>

11. Biarnés M. Revisión de la anemia infecciosa del pollo [Internet]. C. d. S. A. d. C. i. Aragón., CESAC. PV Albéitar. 2011 [cited 2011 Jan 1]. Available from:
<http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/8382/ARTICULOS-AVES-ARCHIVO/Revision-de-la-anemia-infecciosa-del-pollo.html>
12. Witter RL, Sharma JM, Fadly MA. Pathogenicity of variant Marek's disease virus isolants in vaccinated and unvaccinated chickens. *Avian Dis.* 1980;24:210_232.
13. Haridy M, Goryo M, Sasaki J, Okada K. Pathological and immunohistochemical study of chickens with co-infection of Marek's disease virus and chicken anaemia virus,. *Avian Pathol.* 38(6):469–83.
14. Irit DA, Raibshtein I, Al-Touri. A. . Quantitation of Marek's Disease and Chicken Anemia Viruses in Organs of Experimentally Infected Chickens and Commercial Chickens by Multiplex Real-Time PCR. *Avian Dis.* 2013;57(2s1):532–8.
15. Otaki Y, Nunoya T, Tajima M, Tamada H, Nomura Y. Isolation of chicken anaemia agent and Marek's disease virus from chickens vaccinated with turkey herpesvirus and lesions induced in chicks by inoculating both agents. *Avian Pathol* [Internet]. Taylor & Francis; 1987 Jan 1;16(2):291–306. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/03079458708436376>
16. De Boer GF, Jeunseen SHM, Van Roozelaar DJ, Vos GJ, Koch G. Enhancing effect of chicken anemia agent (CAA) on Marek's disease pathogenesis. In: In Proceedings of the 38th Western Poultry Disease Conference, Tempe, AZ Provo, UT. 1989. p. 28.
17. Fehler F, Winter C. CAV infection in older chickens, an apathogenic infection, ,. In: Proceedings of the 2nd International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia. Institute fur Geflugelkrankheiten Justus Liebig University Giessen, Germany,; 2001. p.

391–4.

18. Zanella A, Dall'Ara P, Lavazza A, Marchi R, Morena MA, Rampin T, et al. Interaction between Marek's disease virus and chicken infectious anemia virus. In: Schat KA, Morgan RM, Parcells MS, Spencer JL, editors. *Current Progress on Marek's Disease Research*. Kennett Square, PA: American Association of Avian Pathologists; 2001. p. 11_19.
19. Davidson I, Kedem M, Borochoviz H, Kass N, Ayali G, Hamzani E, et al. Chicken infectious anemia virus infection in Israeli commercial flocks: virus amplification, clinical signs, performance, and antibody status. *Avian Dis*. 2004;48:108_118.
20. Otaki Y, Nunoya T, Tajima M, Kato A, Nomura Y. Depression of vaccinal immunity to Marek's disease by infection with chicken anemia agent. *Avian Pathol*. 1988;17:333–47.
21. Otaki Y, Tajima M, Saito S, Nomura Y. Immune response of chicks inoculated with chicken anemia agent alone or in combination with Marek's disease virus or turkey herpesvirus. *Jpn J Vet Sci*. 1988;50:1040–7.
22. Jeurissen SHM, Janse ME, Van Roozelaar DJ, Koch G, De Boer GF. Susceptibility of thymocytes for infection by chicken anemia virus is related to pre- and hatching development. *Dev Immunol*. 1992;2:123–9.
23. Shat KA, Nair V. Marek's disease. In: Inc DEWJW& S, editor. *Diseases of poultry*. Thirteenth e. 2013. p. 515.
24. Davidson F, Nair V. *Marek's Disease: An evolving Problem*. 1st ed. Fred D, Nair V, editors. Compton, UK: Elsevier B.V.; 2004. 212 p.
25. Gimeno IM. Marek's disease vaccines: A solution for today but a worry for tomorrow? *Vaccine* [Internet]. 2008 Jul [cited 2015 Feb 25];26:C31–41. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X08004465>
26. ICA. *Registro de biológicos veterinarios*. 2013.
27. Suchodolski PF, Izumiya Y, Lupiani B, Ajithdoss DK, Gilad O, Lee LF, et al. Homodimerization of Marek's disease virus-encoded Meq protein is

- not sufficient for transformation of lymphocytes in chickens. *J Virol.* 2009;83(2):859–69.
28. Novak R, Ragland WL. In situ hybridization for detection of chicken anaemia virus in peripheral blood smears. *Mol Cell Probes* [Internet]. 1997 Apr [cited 2015 Feb 25];11(2):135–41. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890850896900961>
 29. Otaaki Y, Nunoya T, Tajima A, Kato A, Nomura Y. Depression of vaccinal immunity to Marek's disease by infection with chicken anaemia agent. *Avian Pathol.* 1988;17:333–47.
 30. NJ C, R. E, Wyeth P, Lister S. "an outbreak of disease due to chicken anaemia agent in broiler chickens in Englad." *Vet Rec.* 1989;124(9):211.
 31. McIlroy SG, McNulty MS, Bruce DW, Smyth JA, Goodall EA, Alcorn MJ. Economic effects of clinical chicken anemia agent infection on profitable broiler production. *Avian Dis.* 1992;36:566–74.
 32. Yuasa N, Taniguchi T, Yoshida I. Effect of infectious bursal disease virus infection on incidence of anaemia by chicken anaemia agent. *Avian Dis.* 1980;24:202–9.
 33. von Bülow V, Rudolph R, Fuchs B. Erhöhte Pathogenität des Erregers der aviären infektiösen Anämie bei Hühnerküken (CAA) bei simultaner Infektion mit Virus der Marekschen Krankheit (MDV), Bursitisvirus (IBDV) oder Reticuloendotheliosevirus (REV). *Zentralbl Veterinarmed B* [Internet]. 1986;33(2):93–116. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0022673393&partnerID=tZOtx3y1>
 34. Engstrom BE. Blue wing isolation of avian reovirus and chicken anemia agent. *Avian Pathol.* 1988;17:23–32.
 35. Haridy M, Goryo M, Sasaki J, Okada K. Pathological and immunohistochemical study of chickens with co-infection of Marek's disease virus and chicken anaemia virus. *Avian Pathol.* 2009;38((6)Dec):469–83.
 36. Yuasa N, Taniguchi T, Yoshida I. "Isolation and some characteristics of

- an agent inducing anemia in chicks." *Avian Dis.* 1979;23:366–85.
37. Yuasa N, Imai. K. Pathogenicity and antigenicity of eleven isolates of chicken anaemia agent (CAA). *Avian Pathol.* 1986;15:639–45.
 38. Natesan S, Kataria JM, Dhama K, Rahul S, Bhardwaj N, Baradhvaj N. Biological and molecular characterization of chicken anaemia virus isolates of Indian origin. *Virus Res* [Internet]. 2006 Jun [cited 2015 Feb 25];118(1-2):78–86. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170205003552>
 39. Farkas T, Maeda K, Sugiura H, Kai K, Hirai K, Otsuki K, et al. A serological survey of chickens, Japanese quail, pigeons, ducks and crows for antibodies to chicken anaemia virus (CAV) in Japan. *Avian Pathol.* 1998;27:316–20.
 40. Todd D, Mackie DP, Mawhinney KA, Conner, McNeilly, F. McNulty MS. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect serum antibody to chicken anemia agent. *Avian Dis.* 1990;34:359–63.
 41. Todd D, Adair BM, McNulty MS, Allan GA. Animal circoviruses. *Adv Virus Res.* 2001;57:1–70.
 42. Adair B. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Dev Comp Immunol* [Internet]. 2000 Mar 1 [cited 2015 Feb 25];24(2-3):247–55. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X99000762>
 43. McNulty M. Chicken anaemia agent: a review. *Avian Pathol.* 1991;20:187±203.
 44. Todd. D. Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS. *Vet Microbiol.* 2004;98:169–74.
 45. LM García A V., Bermudez V, Salem M, Brett. M. Patogenicidad y detección molecular del virus de la anemia infecciosa aviar en pollos de engorde en Venezuela. In: XX Congreso Latinoamericano de Avicultura Brasil [Internet]. 2007. Available from: <http://www.colaves.com>
 46. Pope CR. Chicken anemia agent. *Vet Immunol Immunopathol.* 1991;30:51–65.

47. Lee M-S, Lien Y-Y, Feng S-H, Huang R-L, Tsai M-C, Chang W-T, et al. Production of chicken anemia virus (CAV) VP1 and VP2 protein expressed by recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem.* 2009;44:390–5.
48. Pringle CR. Chicken Anemia Virus. In: *Proceedings of the XI International Congress of Virology on Virus Taxonomy*, Sydney, Australia. 1999. p. 2065–70.
49. Schat K. Chicken anemia virus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;331:151–83.
50. MH N, GF de B, DJ van R, C K, O K, JG V. Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *J Virol.* 1991;65:3131–9.
51. Noteborn MHM, Kranenburg O, Zantema A, Koch G, De Boer GF, Van der Eb AJ. Transcription of the chicken anemia virus (CAV) genome and synthesis of its 52-kDa protein. *Gene.* 1992;118:267–71.
52. Noteborn M, Todd D, Verschueren C, Gauw H de, Curran W, Veldkamp S. A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *J Virol.* 1994;68:346–51.
53. Douglas A, Phenix K, Mawhinney K, Todd D, Mackie D, Curran W. Identification of a 24 kDa protein expressed by chicken anaemia virus. *J Gen Virol.* 1995;76:1557–62.
54. Noteborn M. Chicken anemia virus induced apoptosis: underlying molecular mechanisms. *Vet Microbiol.* 98:89–94.
55. Douglas A, Phenix K, Mawhinney K, Todd D, Mackie D, Curran W. Identification of a 24 kDa protein expressed by chicken anaemia virus. *J Gen Virol.* 1995;76:1557–62.
56. Pallister J, Fahey KJ, Sheppard M. Cloning and sequencing of the chicken anaemia virus (CAV) ORF-3 gene, and the development of an ELISA for the detection of serum antibody to CAV. *Vet Microbiol* [Internet]. 1994 Mar [cited 2015 Feb 25];39(1-2):167–78. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378113594900973>

57. Peters M, Jackson D, Crabb B, Browning G. Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase. *J Biol Chem.* 2002;277:39566–73.
58. McNulty MS, Curran WL, Todd D, Mackie DP. Chicken anemia agent: An electron microscopic study. *Avian Dis.* 1990;34:352–8.
59. Renshaw RW, Soine C, Weinkle T, O'Connell PH, Ohashi K, Watson S, et al. A hypervariable region in VP1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture. *J Virol.* 1996;70:8872–8.
60. Yamaguchi, S., Imada T, Kaji N, Mase M, Tsukamoto K, Tanimura N, et al. Identification of a genetic determinant of pathogenicity in chicken anaemia virus. *J Gen Virol.* 2001;82:1233–8.
61. Mathieu HM, Noteborn, A. MA, Oorschot D, Der EAJ van. Chicken Anemia Virus: Induction of Apoptosis by a Single Protein of a Single-Stranded DNA Virus. *Semin Virol.* 1998;8(Article No. VI980154):497–504.
62. Miller M, Schat KA. Chicken infectious anemia virus: An example of the ultimate host-parasite relationship. *Avian Pathol.* 2004;48:734–45.
63. Davidson I, Artzi N, Shkoda I, Lublin A, Loeb E, Schat KA. The contribution of feathers in the spread of chicken anemia virus. *Virus Res* [Internet]. 2008 Mar [cited 2015 Feb 25];132(1-2):152–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170207004509>
64. Bülow V, von Schat KA. Chicken infectious anemia. In: Calnek BW (Ed. ., editor. *Diseases of Poultry.* 10th ed. Iowa State University Press, Ames; 1997. p. 739–56.
65. Rosemberger J, Cloud. S. The isolation and Characterization of chicken anemia agent (CAA) from broilers in the United States. *Avian Dis.* 1989;33:707–13.
66. Gholami-Ahangaran M, Zia-Jahromi. N. Chicken anemia virus infection in broiler chickens vaccinated and not vaccinated for avian influenza in Iran. *J Appl Poult Res.* 2012;21(2):413–7.
67. Davidson I, Shkoda I. The impact of feathers on the detection and study

- of DNA viral pathogens in commercial poultry. *World's Poult Sci Assoc J.* 2005;61:407–17.
68. Tan J, Tannock G. Role of viral load in the pathogenesis of chicken anemia virus. *J Gen Virol.* 2005;86:1327–33.
 69. Prasetyo AA, K. T, Kuroishi A, Murakami K, Hino. S. “Replication of chicken anemia virus (CAV) requires apoptin and is complemented by VP3 of human torque teno virus (TTV).” *Virology.* 2009;385:85–92.
 70. McConnell C, Adair B, McNulty M. Effects of chicken anemia virus on macrophage function in chickens. *Avian Dis.* 1993;37:358±65.
 71. Hu L-B, Lucio B, Schat KA. Abrogation of age-related resistance to chicken infectious anemia by embryonal bursectomy. *Avian Dis.* 1993;37:157–69.
 72. Sommer F, Cardona C. Chicken anemia virus in broilers dynamics of infection in two commercial broiler flocks. *Avian Dis.* 2003;47:1466–73.
 73. Noteborn MHM, Koch G. Chicken anemia virus infection: Molecular basis of pathogenicity. *Avian Pathol.* 1995;24:11–31.
 74. Meehan BM, Todd D, Creelan JL, Earle JAP, Hoey EM, McNulty MS. Characterization of viral DNAs from cells infected with chicken anaemia agent: Sequence analysis of the cloned replicative form and transfection capabilities of cloned genome fragments. *Arch Virol.* 1992;124:301–19.
 75. Smyth J, Moëat D, McNulty M, Todd D, Mackie D. A sequential histopathologic and immunocyto- chemical study of chicken anemia virus infection at one day of age. *Avian Dis.* 1993;37:324±38.
 76. Taniguchi T, Yuasa N, Maeda M, Horiuchi H. Chronological observations on hemato-pathological changes in chicks inoculated with chicken anemia agent. *Nat Inst Anim Hlth Quart.* 1983;23:1±12.
 77. Jeurissen S, Pol J, Boer G De. Transient depletion of cortical thymocytes induced by chicken anaemia agent. *Thymus.* 1989;14:115±23.
 78. McNeilly F, Allan G, Moëat D, McNulty M. Detection of chicken anaemia agent in chickens by immunofluorescence and immunoperoxidase

- staining. *Avian Pathol.* 1991;20:125±32.
79. Imai K, Mase M, Tsukamoto K, Hihara H, Yuasa N. Persistent infection with chicken anaemia virus and some effects of highly virulent infectious bursal disease virus infection on its persistency. *Res Vet Sci* [Internet]. 1999 Dec [cited 2015 Feb 25];67(3):233–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528899903132>
 80. Adair B, McNeilly F, McConnell C, Todd D, Nelson R, McNulty M. Effects of chicken anemia agent on lymphokine production and lymphocyte transformation in experimentally infected chickens. *Avian Dis.* 1991;35:783±92.
 81. Brentano L, Lazzarin S, Bassi SS, Klein TAP, Schat KA. Detection of chicken anemia virus in the gonads and in the progeny of broiler breeder hens with high neutralizing antibody titers. *Vet Microbiol* [Internet]. 2005 Jan 5 [cited 2015 Feb 25];105(1):65–72. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113504003566>
 82. Otaki Y, Saito K, Tajima M, Nomura Y. Persistence of maternal antibody to chicken anemia agent and its effect on the susceptibility of young chickens. *Avian Pathol.* 1992;21:147–51.
 83. Malo A, Weingarten M. Determination of the minimum protective neutralizing antibody titer to CAV in adult chickens. *Intervet VSD Newslett.* 1995;11.:1–5.
 84. Imai K, Yuasa N. *Advances in Marek's Disease Research.* null, editor. 1988. pp. 414–418.
 85. Bullock V. Infectious anemia. In: B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, W.M. Reid and H.W. Yoder J, editor. *Diseases of Poultry.* 9th ed. Ames, Iowa.: Iowa State University Press,; 1991.
 86. Toro H. Pathogenicity of chicken anaemia virus. Isolate 10343. for young and older chicken. *Avian Pathol.* 1997;26:485–99.
 87. Saulo H. U-V, Claudia A N-B, Ana María A-F, William M, Ana O, Elita G. Detección de títulos de anticuerpos contra Anemia Infecciosa Aviar y su relación con otros virus inmunosupresores en pollos de engorde. *Estado*

- Zulia. Venezuela. Rev cient. 2007;17(4):357–65.
88. Mardani HN a. K. Molecular characterization of the chicken anaemia viruses isolated from broiler farms of west Aerbaijan, Iran. Avian Pathol. 2013;42(2):108–13.
 89. D&n C, Farkas T, NCmeth I. Serological survey on the prevalence of chicken anaemia virus infection in Hungarian chicken flocks. Vet Microbiol. 1996;50:7–16.
 90. Saulo H. U-V, Claudia A N-B, Ana María A-F, William M, Ana O, Elita G. “Detección de títulos de anticuerpos contra anemia infecciosa aviar y su relación con otros virus inmunosupresores en pollos de engorde.” FCV-LUZ. 2007;XVII(4):357–65.
 91. Cardoso B. “anemia infecciosa aviar.” [Internet]. Asociación española de ciencia avícola. 2006 [cited 2014 May 5]. Available from: http://detodounpoco2021.bligoo.es/media/users/24/1220632/files/356618/ANEMIA_INFECIOSA_Control_de_inmunosupresion.pdf
 92. Imai K, Mase M, Yamaguchi S, Yuasa N, Nakamura K. Detection of chicken anaemia virus DNA from formalin-fixed tissues by polymerase chain reaction. Res Vet Sci [Internet]. 1998 May [cited 2015 Feb 25];64(3):205–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528898901266>
 93. McNulty MS, Allan GM. Applications of immunofluorescence in veterinary viral diagnosis. Recent Adv Virus Diagnosis. 1984;15–26.
 94. McNulty MS. Chicken anaemia virus. a laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 4th American association of pathologists, Kennet square; 1998.
 95. Todd D MK, MS. M. “Detection and differentiation of chicken anemia virus isolates by using the polymerase chain reaction.” J Clin Microbiol. 1992;30:1661–6.
 96. Davidson I, Borenshtain R. The feather tips of commercial chickens are a favorable source of DNA for the amplification of Marek’s disease virus and avian leukosis virus, subgroup J. Avian Pathol [Internet]. Taylor &

Francis; 2002 Jun 1;31(3):237–40. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1080/03079450220136549>

97. Davidson I, Borenshtain R. Novel applications of feather tip extracts from MDV-infected chickens; diagnosis of commercial broilers, whole genome separation by PFGE and synchronic mucosal infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* [Internet]. 2003 Oct [cited 2015 Mar 15];38(3):199–203. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928824403001779>
98. Taylor S. National veterinary services laboratory (NVSL). IA: USDA, ARS; 1989;
99. Nestor L, Tamas F, Rogelio. A. Caracterización molecular de aislamientos mexicanos del virus de la anemia infecciosa del pollo, a través del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción. *Vet Mex*. 2007;38(1).
100. Hermann J, Koski D, Taylor S, Gatewood D. Evaluation of the analytical sensitivity of a polymerase chain reaction assay for the detection of chicken infectious anemia virus in avian vaccines. *Biologicals* [Internet]. 2012 Jul [cited 2015 Feb 25];40(4):266–9. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1045105612000693>
101. M. FD, Owoade A, Abiola J, Muller CP. Molecular epidemiology of chicken anemia virus in Nigeria. *Arch Virol*. 2006;151:97–111.
102. Brentano L et al. Isolation and Identification of Chicken Infectious Anaemia Virus in Brazil. *Avian Dis*. 1991;35:793–800.
103. Buscaglia C et al. Identification of chicken anaemia, isolation of the virus and reproduction of the disease in Argentina. *Avian Pathol*. 1994;23:297–304.
104. Varela APM, Cibulski HF dos SSP, Scheffer CM, Schmidt C, Lima FES, Silva AD, et al. Chicken anemia virus and avian gyrovirus 2 as contaminants in poultry vaccines. *Biologicals*. 2014;42:346–50.
105. Urdaneta S, Andrade LF, Parra. O. Estudio serológico y valores de hematocrito para la Anemia Infecciosa Aviar en pollos de engorde de los

- municipios Mara y La Cañada de Urdaneta del estado Zulia. In: VI Congreso Nacional de Avicultura Memorias. 1996. p. 537–43.
106. Noguera c. R De, Rolo m. De, Godoy A, Herrera A, Martínez Y, Álvarez L, et al. Agentes infecciosos que afectan la Salud Aviar. In: Jornadas Científicas del CENIAP. Maracay, Venezuela.; 2001.
 107. Oviedo B. Detección y caracterización molecular del virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa en granjas de pollos de engorde en el municipio mara, estado Zulia, Maracaibo. Venezuela Microbiología. Universidad de Zulia.; 2009.
 108. Villegas Pedro AE. Anemia infecciosa aviar. Avic Empres. 1996;55.(29.).
 109. Hopkins. FL y. B. Consideraciones de protección contra el CAV. Avic Prof. 2006;24(6):12–3.
 110. Goryo M, Shibata Y, Suwa T, Umemura T, Itakura C. Outbreak of anaemia associated with chicken anaemia agent in young chicks. Jap J Vet Sci. 1987;49:867±73.
 111. McNamee P, McCullagh J, Rodgers J, Thorp B, Ball H, Connor T, et al. Development of an experimental model of bacterial chondronecrosis with osteomyelitis in broilers following exposure to *Staphylococcus aureus* by aerosol, and inoculation with chicken anaemia and infectious bursal disease viruses. Avian Pathol. 1999;28:26±35.
 112. Hornok S, Heijmans J, Bekesi L, Peek H, Kovacs MD-, Dren C, et al. Interaction of chicken anaemia virus and *Cryptosporidium baileyi* in experimentally infected chickens. Vet Parasitol. 1998;76:43±55.
 113. Witter RL, Schat KA. Marek's disease . In: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., McDougald, L.R., Swayne DE, editor. Diseases of Poultry. 11th ed. Iowa State University Press, Ames,; 2003. p. 407–65.
 114. Otaaki Y, Nunoya T, Tajima T, Kato A, Nomura Y. Depression of vaccinal immunity to Marek's disease by infection with chicken anaemia agent. Avian Pathol. 1988;17:333–47.
 115. Miles AM, Reddy SM, Morgan RW. No Title. Avian Dis. 2001;45(null):9.

116. Mohamed Faizal Abdul-Careem, Hunter BD, Nagy É, Read LR, Sanei B, Spencer JL, et al. Development of a real-time PCR assay using SYBR Green chemistry for monitoring Marek's disease virus genome load in feather tips. *J Virol Methods*. 2006;133(1, April):34–40.
117. Gimeno IM, Fletcher OJ, Montiel E, Orlando Osuna N, Majó RD, Smyth JA, et al. Enfermedades inmunosupresoras en avicultura. Servet E, editor. 2013. 192 p.
118. Churchill AE, Biggs PM. Agent of Marek's disease in tissue culture. *Nature*. 1967;21:528–30.
119. Buscaglia C, Nervi P, Risso M. Characterization of four very virulent Argentinian strains of Marek's disease virus end the influence of one of those isolates on synergism between marek's disease vaccine viruses,. *Avian Pathol*. 2005;33(2):190–5.
120. Baigent SJ, Petherbridge LJ, Howes K, Smith LP, Currie RJW, Nair VK. Absolute quantitation of Marek's disease virus genome copy number in chicken feather and lymphocyte samples using real-time PCR. *J Virol Methods* [Internet]. 2005 Jan [cited 2015 Apr 3];123(1):53–64. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016609340400268X>
121. Morrow C, Fehler F. Marek's disease: a worldwide problem. In: In F. Davison & V. Nair (Eds.), editor. *Marek's Disease: An Evolving Problem*. Elsevier A. London.; 2004. p. 49_61.
122. Calnek B, Barnes H, Beard W, McDougald R. Enfermedades de las aves. *Manual Moderno*,. 29 B, editor. México, .; 2000.
123. Venugopal K. Marek's disease: an update on oncogenic mechanisms and control. *Res Vet Sci*. 2000;69.:17–23.
124. Witter RL, Schat KA. Marek's Disease. In: In: Saif YM, editor. *Diseases of Poultry*. Iowa State. Ames, Iowa.; 2001. p. 407–67.
125. Purchase HG, Okazaki W. Effect of vaccination with herpesvirus of turkeys (HVT) on horizontal spread of Marek's disease herpesvirus. *Avian Dis*. 1971;15:391–7.

126. Van Resenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner RB, editor. Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York, NY: Academic Press,; 1999.
127. Islam A, Cheetham BF, Mahony TJ, Young PL, Walkden-Brown SW. Absolute quantitation of Marek's disease virus and Herpesvirus of turkeys in chicken lymphocyte, feather tip and dust samples using real-time PCR. J Virol Methods [Internet]. 2006 Mar [cited 2015 Mar 15];132(1-2):127–34. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093405003149>
128. Islam A, Harrison B, Cheetham BF, Mahony TJ, Young PL, Walkden-Brown SW. Differential amplification and quantitation of Marek's disease viruses using real-time polymerase chain reaction. J Virol Methods. 2004;119:103–13.
129. Witter RL, Calnek BW, Buscaglia C, Gimeno IM, Schat KA. Classification of Marek's disease viruses according to pathotype: philosophy and methodology. Avian Pathol [Internet]. Taylor & Francis; 2005 Apr 1;34(2):75–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/03079450500059255>
130. Osterrieder N, Kamil JP, Schumacher D, Tischer BK, Trapp S. Marek's disease virus: from miasma to model. Nat Rev Microbiol. 2006;4:283–94.
131. Su S, Cui N, Zhou Y, Chen Z, Li Y, Ding J, et al. A recombinant field strain of Marek's disease (MD) virus with reticuloendotheliosis virus long terminal repeat insert lacking the meq gene as a vaccine against MD. Vaccine [Internet]. 2015 Jan 29 [cited 2015 May 10];33(5):596–603. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X14017125>
132. Swiss institute bioinformatics. Viral zone [Internet]. 2012 [cited 2014 May 20]. Available from: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/522.html
133. Brunovskis P, Velicer. LF. The Marek's disease virus (MDV) unique short

region: alphaherpesvirus-homologous, fowlpox virus-homologous, and MDV-specific genes. *Virology*. 1995;206(1):324–38.

134. Lee LF, Wu P, Sui D, Ren D, Kamil J, Kung HJ, et al. The complete unique long sequence and the overall genomic organization of the GA strain of Marek's disease virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(11):6091–6.
135. Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Rock DL, Kutish GF. The genome of a very virulent Marek's disease virus. *J Virol*. 2000;74(17):7980–8.
136. Wu P, Lee LF, Reed WM. Serological characteristics of a membrane glycoprotein gp82 of Marek's disease virus. *Avian Dis*. 1997;41(4):824–31.
137. Schumacher D, Tischer BK, Reddy SM, Osterrieder N. Glycoproteins E and I of Marek's disease virus serotype 1 are essential for virus growth in cultured cells. *J Virol*. 2001;75(23):11307–18.
138. Tischer BK, Schumacher D, Messerle M, Wagner M, Osterrieder N. The products of the UL10 (gM) and the UL49.5 genes of Marek's disease virus serotype 1 are essential for virus growth in cultured cells. *J Genet Virol*. 2002;83(Pt 5):997–1003.
139. Payne LN. Marek's disease virus (Herpesviridae). *Encycl Virol*. 1999;2:945–6.
140. Cho BR. Dual virus maturation of both pathogenic and apathogenic Marek's disease herpesvirus (MDHV) in the feather follicles of dually infected chickens. *Avian Dis*. 1977;21:501–7.
141. Nazerian K, Solomon JJ, Witter RL, Burmester BR. Studies on the etiology of Marek's disease. II. Finding of a herpes virus in a cell culture. *Proc Exp Biol Med*. 1968;127:177–82.
142. Witter RL, Calnek BW, Buscaglia C, Gimeno IM, Schat KA. Classification of Marek's disease viruses according to pathotype: philosophy and methodology. *Avian Pathol*. 2005;34:75–90.
143. Rosenberger JK, Cloud SS, Olmeda-Miro N. Epizootiology and adult transmission of Marek's disease. In: *the Avian Tumor Virus Symposium*.

Reno, NV,; 1997.

144. Witter. RL. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Dis.* 1997;41(1):149–63.
145. Calnek BW, Harris RW, Buscaglia C, Schat KA, Lucio. B. Relationship between the immunosuppressive potential and the pathotype of Marek's disease virus isolates. *Avian Dis.*, 1998;42(1):124–32.
146. Gimeno M, Witter RL, Reed. WM. Four distinct neurologic syndromes in Marek's disease: effect of viral strain and pathotype. *Avian Dis.*, 1999;43(4):721–37.
147. Haq K, Schat KA, Sharif. S. Immunity to Marek's disease: Where are we now? *Dev Comp Immunol.* 2013;41:439–46.
148. Calnek BW, Adldinger HK, Kahn DE. Feather follicle epithelium: a source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian Dis.* 1970;14:219–33.
149. Carrozza JH, Fredrickson TN, Prince RP, Luginbuhl RE. Role of desquamated epithelial cells in transmission of Marek's disease. *Avian Dis.*, 1973;17:767–81.
150. Baigent SJ, Smith LP, Nair VK, Currie RJW. Vaccinal control of Marek's disease: current challenges, and future strategies to maximize protection. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;112(1-2):78–86.
151. Baigent S, Davison F. Marek's disease virus: biology and life cycle. In: Davidson F, Nair V, editors. *Marek disease virus: An Evolving Problem.* 1st ed. Compton, UK: Elsevier B.V.; 2004. p. 212.
152. Biggs PM. The history and biology of Marek's disease virus. In: Hirai K, editor. *Current Topics in Microbiology and Immunology.*, Berlin: Springer-Verlag; 2001. p. 1–24.
153. Cho KO, Park NY, Endoh D, Ohashi K, Sugimoto C, Itakura C, et al. Cytology of feather pulp lesions from Marek's disease (MD) virus-infected chickens and its application for diagnosis and prediction of MD. *J Vet Med Sci.* 1998;60:843–7.

154. Calnek BW. Pathogenesis of Marek's disease virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2001;255:25–55.
155. Becker Y, Tabor E, Asher Y, Davidson I, Malkinson M, Witter RL. PCR detection of amplified 132 bp repeats in Marek's disease virus type 1 (MDV-1) DNA can serve as an indicator for critical genomic rearrangement leading to the attenuation of virus virulence. *Virus Genes.* 1993;7.:277–87.
156. Becker Y, Asher Y, Tabor E, Davidson I, Malkinson M, Weisman Y. Polymerase chain reaction for differentiation between pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDV) and vaccine viruses of MDV-serotypes 2 and 3. *J Virol Methods [Internet].* 1992 Dec [cited 2015 Mar 15];40(3):307–22. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016609349290089V>
157. Young P, Gravel J. Rapid diagnosis of Marek's disease virus in blood and other tissues using PCR. *Curr Res.* 1996;
158. Bumstead N, Sillibourne J, Rennie M, Ross N, Davison F. Quantification of Marek's disease virus in chicken lymphocytes using the polymerase chain reaction with fluorescence detection. *J Virol Meth.* 1997;65:75–81.
159. Burgess SC, Davison TF. A quantitative duplex PCR technique for measuring amounts of cell-associated Marek's disease virus: differences in two populations of lymphoma cells. *J Virol Methods.* 1999;82:27–37.
160. Handberg KJ, Nielsen OL, Jørgensen PH. The use of serotype 1- and serotype 3-specific polymerase chain reaction for the detection of Marek's disease virus in chickens. *Avian Pathol [Internet].* Taylor & Francis; 2001 Jun 1;30(3):243–9. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03079450120054659>
161. Zhu GS, Ojima T, Hironaka T, Ihara T, Mizukoshi N. Differentiation of oncogenic and nononcogenic strains of Marek's disease virus type 1 by using polymerase chain reaction DNA amplification. *Avian Dis.,* 1992;36:637–45.
162. Lee SI, Takagi M, Ohashi K, Sugimoto C, Onuma. M. Difference in the

- meq gene between oncogenic and attenuated strains of Marek's disease virus serotype 1. *J Vet Med Sci.* 2000;62:287–92.
163. Chang K-S, Ohashi K, Onuma M. Diversity (polymorphism) of the meq gene in the attenuated Marek's disease virus (MDV) serotype 1 and MDV-transformed cell lines. *J Vet Med Sci. Japan;* 2002 Dec;64(12):1097–101.
164. Murata S, Chang KS, Lee SI, Konnai S, Onuma M, Ohashi K. Development of a nested polymerase chain reaction method to detect oncogenic Marek's disease virus from feather tips. *J Vet Diagn Invest.* 2007;19.:471–8.
165. Gopal S, Manoharan P, Kathaperumal K, Chidambaram B, K.C. Divya. Differential detection of avian oncogenic viruses in poultry layer farms and turkeys by use of multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2668–73.
166. Kaiser P, Underwood G, Davison F. Differential cytokine responses following Marek's disease virus infection of chickens differing in resistance to Marek's disease. *J Virol.* 2003;77:762–8.
167. Levy AM, Burgess SC, Davidson I, Underwood G, Leitner G, Heller ED. Interferon-containing supernatants increase Marek's disease herpesvirus genomes and gene transcription levels, but not virion replication in vitro. *Viral Immunol.* 2003;16:501–9.
168. Singh SD, Barathidasan R, Kumar A, Deb R, Verma AK, Dhama K. Recent Trends in Diagnosis and Control of Marek's Disease (MD) in Poultry. *Pakistan J Biol Sci.* 2012;15:964–70.
169. Abdul-Careem MF, Hunter BD, 'Eva Nagy LR, Read, Babak Sanei JLS, Sharif. S. .Development of a real-time PCR assay using SYBR Green chemistry for monitoring Marek's disease virus genome load in feather tips.. *J Virol Methods.* 2006;133:34–40.
170. Wei X, Shi X, Zhao Y, Zhang J, Wang M, Liu C, et al. Development of a rapid and specific loop-mediated isothermal amplification detection method that targets Marek's disease virus meq gene. *J Virol Methods* [Internet]. 2012 Aug [cited 2015 Mar 15];183(2):196–200. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093412001413>

171. Notomi T, Okayama H, Yonekawa T, Watana K, Amino N, Hase T. Loopmediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:63.
172. OIE. CHAPTER 2.3.13. MAREK'S DISEASE. OIE Terrestrial Manual. In: Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May. 2010.
173. Bello N, Francino O, Sanchez A. Isolation of genomic DNA from feathers. *J Vet Diagn Invest.* 2001;13:162–4.
174. Shamblin CE, Greene N, Arumugaswami V, Dienglewicz RL, Parcels MS. Comparative analysis of Marek's disease virus (MDV) glycoprotein-, lytic antigen pp38- and transformation antigen Meq-encoding genes: association of meq mutations with MDVs of high virulence. *Vet Microbiol* [Internet]. 2004 Sep 8 [cited 2015 Apr 10];102(3-4):147–67. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113504002160>
175. Chan HM, L. Smith NB. La Thangue Role of LXCXE motif-dependent interactions in the activity of the retinoblastoma protein. *Oncogene.* 2001;20(43):6152–63.
176. Zhang Z, Liu S, Ma C, Zhao P, Cui Z. Absolute quantification of a very virulent Marek's disease virus dynamic quantity and distributions in different tissues 1. *Poult Sci. England;* 2015 Jun;94(6):1150–7.
177. Witter RL. Proceedings of the 6th International Symposium on Marek's Disease. null, editor. 2001. pp. 1–9.
178. Witter RL, Lee LF. Polyvalent Marek's disease vaccines: Safety, efficacy and protective synergism in chickens with maternal antibodies. *Avian Pathol.* 1984;13:75–92.
179. Witter RL, Silva RF, Lee LF. New serotype 2 and attenuated serotype 1 Marek's disease vaccine viruses: selected biological and molecular characteristics. *Avian Dis.* 1987;31:829–40.
180. Lee SI, Ohashi K, Morimura T, Sugimoto C, Onuma M. Reisolation of

- Marek's disease virus from T cell subsets of vaccinated and non-vaccinated chickens. *Arch Virol.* 1999;144:45–54.
181. Markowski-Grimsrud CJ, Schat. KA. Cytotoxic T lymphocyte responses to Marek's disease herpesvirus-encoded glycoproteins *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002;90((3/4)):133–44.
 182. Varela APM, Dos Santos HF, Cibulski SP, Scheffer CM, Schmidt C, Sales Lima FE, et al. Chicken anemia virus and avian gyrovirus 2 as contaminants in poultry vaccines. *Biologicals* [Internet]. 2014 Nov [cited 2015 Feb 25];42(6):346–50. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1045105614000797>
 183. Burgess SC. Marek's Disease: An Evolving Problem. null, editor. 2004. pp. 98–111.
 184. Atkins KE. Epidemiology and evolution of Marek's Disease virus. 2010; Available from: <http://hdl.handle.net/1842/4617>
 185. Zhang Y, Li Z, Bao K, Lv H, Gao Y, Gao H, et al. Pathogenic characteristics of Marek's disease virus field strains prevalent in China and the effectiveness of existing vaccines against them. *Vet Microbiol.* 2015;
 186. Antioquia. G de. Datos Generales del Departamento: Antioquia. República de Colombia. Página oficial. [Internet]. 2015. Available from: <http://antioquia.gov.co/>
 187. Dohoo I, Martin W, Stryhn H. Sampling: Sampling to detect disease. In: Island. U of PE, editor. *Veterinary epidemiologic research.* Charlottet. p. 47.
 188. Rose K, Newman Sc, Uhart M, Lubroth J. Vigilancia de la influenza aviar altamente patógena en las aves silvestres. *Wildl Conserv.* 2007;58.
 189. Sambrook J, Russell. DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001;
 190. Baigent SJ, Smith LP, Petherbridge LJ, Nair VK. Differential quantification of cloned CVI988 vaccine strain and virulent RB-1B strain of Marek's disease viruses in chicken tissues, using real-time PCR. *Res Vet Sci*

- [Internet]. 2011 Aug [cited 2015 Mar 15];91(1):167–74. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528810002675>
191. Sacco MA, Howes K, Smith LP, Nair VK. Assessing the Roles of Endogenous Retrovirus EAV-HP in Avian Leukosis Virus Subgroup J Emergence and Tolerance. *J Virol* [Internet]. American Society for Microbiology; 2004 Oct 22;78(19):10525–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC516401/>
 192. Asuar LE. Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Thought A Rev Cult Idea*. 2007;110034(11):517–40.
 193. Segretin M. Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales) . [Internet]. Argenbio. INGEBI- CONICET- Dpto FB MyC, FCEyN- UBA. 2014 [cited 2014 Feb 20]. Available from: <http://www.argenbio.org/adf/uploads/pdf/Cultivos celulares I Euge.pdf>
 194. IAN. FR. Culture of animal cells a manual of basic technique. Fourth edi. Liss W, editor. New York; 2000.
 195. J. S. Cultivo y caracterización in vitro de una línea de fibroblastos gingivales humanos. *Rev Estomatol*. 2000;9(no. 1 - julio).
 196. Sellers H. Laboratory manual avian viral diseases. PDRC. . University of Georgia. 2014. p. 300.
 197. Landman WJM, Verschuren SBE. Titration of Marek's Disease Cell-Associated Vaccine Virus (CVI 988) of Reconstituted Vaccine and Vaccine Ampoules from Dutch Hatcheries. *Avian Dis* [Internet]. American Association of Avian Pathologists; 2003 Oct 1;47(4):1458–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1637/7034>
 198. Ramírez C, Castro F, Gimeno I. Evaluación de las técnicas de diagnóstico de la enfermedad de Marek. *Rev Colomb Cienc Anim*. 2010;3(1):69–78.
 199. Renz KG, Islam A, Cheetham BF, Walkden-Brown SW. Absolute quantification using real-time polymerase chain reaction of Marek's disease virus serotype 2 in field dust samples, feather tips and spleens. *J Virol Methods* [Internet]. 2006 Aug [cited 2015 Apr 3];135(2):186–91.

Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093406000991>

200. Davidson I, Borenshtain R, Weisman Y. Molecular identification of the Marek's disease virus vaccine strain CVI988 in vaccinated chickens. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2002;49(2):83–7.
201. Cho KO, Endoh G, 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 Pathol*. 1999;28:47±53.
202. QIAGEN. QIAquick® Gel Extraction Kit. In: Quick-Start Protocol. 2010. p. 2.
203. Jeltsch JMR, Hen L, Maroteaux JM, Garnier P, Chambon. Sequence of the chicken ovotransferrin gene. *Nucl Acids Res*. 1987;15:7643–5.
204. Sellers SM. A quantitative analysis of Marek's disease virus in relation to host genetic resistance. University of Bristol, UK.; 2001.
205. Jones D, Lee L, Liu J-L, Rung H-J, 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 U S A* [Internet]. Department of Molecular Biology, Case Western Reserve University, School of Medicine, Cleveland, OH 44106, United States; 1992;89(9):4042–6. Available from:
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0026559338&partnerID=40&md5=64991e6150d42ac9590ef7ec933e0a6f>
206. Burmester BR, Purchase HG, Okazaki W. Long-term experiences with the herpesvirus of turkeys (HVT) as a vaccine against Marek's disease. *Prog Immunobiol Stand*. 1972;5:132–8.
207. Okazaki W, Purchase HG, Burmester BR. Protection against Marek's disease by vaccination with a herpesvirus of turkeys. *Avian Dis*. 1970;14:413–29.
208. Islam T, Walkden-brown SW, Renz KG, Islam AFMF, Ralapanawe S. Replication kinetics and shedding of very virulent Marek ' s disease virus and vaccinal Rispens / CVI988 virus during single and mixed infections varying in order and interval between infections. *Vet Microbiol* [Internet].

Elsevier B.V.; 2014;173(3-4):208–23. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.07.027>

209. Niesters HG. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods*. 2001;25:419–29.
210. I.M. Mackay KE, Arden AN. Real-time PCR in virology. *Nucl Acids Res*. 2002;30:1292–305.
211. Pevenstein SR, Williams RK, McChesney D, Mont EK, Smialek JE, Straus SE. Quantitation of latent varicella-zoster virus and herpes simplex virus genomes in human trigeminal ganglia. *J Virol*. 1999;73:10514–8.
212. Baigent SJ, Ross LJN, Davison TF. Differential susceptibility to Marek's disease is associated with differences in number, but not phenotype or location, of pp38+ lymphocytes. *J Gen Virol*. 1998;79:2795–802.
213. Davidson I, Borenshtain R. Novel applications of feather tip extracts from MDV-infected chickens; diagnosis of commercial broilers, whole genome separation by PFGE and synchronic mucosal infection FEMS. *Immunol Med Microbiol*. 2003;38:199–203.
214. Gandon S, Mackinnon MJ, Nee S, Read AF. Imperfect vaccines and the evolution of pathogen virulence. *Nature*. England; 2001 Dec;414(6865):751–6.
215. Haq K, Fear T, Ibraheem A, Abdul-Careem MF, Sharif S. Influence of vaccination with CVI988/Rispens on load and replication of a very virulent Marek's disease virus strain in feathers of chickens. *Avian Pathol*. 2012;41(1):69–75.
216. Doosti A, Golshan M. Molecular study for detection of Marek's disease virus (MDV) in southwest of Iran. 2011;6(12):2560–3.
217. Zhang Y, Liu C, Zhang F, Shi W, Li J. Sequence analysis of the Meq gene in the predominant Marek's disease virus strains isolated in China during 2006-2008. *Virus Genes*. 2011;Dec, 43((3)):353–7.
218. Murata S, Hashiguchi T, Hayashi Y, Yamamoto Y, Matsuyama-Kato A, Takasaki S, et al. Characterization of Meq proteins from field isolates of Marek's disease virus in Japan. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2013 Jun

- [cited 2015 May 10];16:137–43. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134813000208>
219. Luo J, Yu ZH, Teng M, Wang XW, Ding K, Yu L Le, et al. Molecular characteristics and evolutionary analysis of field Marek's disease virus prevalent in vaccinated chicken flocks in recent years in China. *Virus Genes*. 2013;47(2):282–91.
 220. Todd D. Circoviruses: Immunosuppressive threats to avian species: A review. *Avian Pathol* [Internet]. Taylor & Francis; 2000 Oct 1;29(5):373–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/030794500750047126>
 221. Davidson I, Kedem M, Borochoviz H, Kass N, Ayali G, Hamzani E, et al. Chicken Infectious Anemia Virus Infection in Israeli Commercial Flocks: Virus Amplification, Clinical Signs, Performance, and Antibody Status. *Avian Dis* [Internet]. American Association of Avian Pathologists; 2004 Jan 1;48(1):108–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1637/7072>
 222. Bhatt P, Shukla SK, Mahendran M, Dhama K, Chawak MM, Kataria JM. Prevalence of Chicken Infectious Anaemia Virus (CIAV) in Commercial Poultry Flocks of Northern India: A Serological Survey. *Transbound Emerg Dis* [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 2011 Oct 1;58(5):458–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01215.x>
 223. Ducatez MF, Chen H, Guan Y, Muller CP. Molecular Epidemiology of Chicken Anemia Virus (CAV) in Southeastern Chinese Live Birds Markets. *Avian Dis* [Internet]. American Association of Avian Pathologists; 2008 Mar 1;52(1):68–73. Available from: <http://www.aaapjournals.info/doi/abs/10.1637/8049-070407-Reg>
 224. Owoade AA, Oluwayelu DO, Fagbohun OA, Ammerlaan W, Mulders MN, Muller CP. Serologic Evidence of Chicken Infectious Anemia in Commercial Chicken Flocks in Southwest Nigeria. *Avian Dis* [Internet]. American Association of Avian Pathologists; 2004 Jan 1;48(1):202–5. Available from: <http://www.aaapjournals.info/doi/abs/10.1637/7075>
 225. Nogueira EO, J Piantino Ferreira A, Martins Soares R, Luiz Durigon E, Lazzarin S, Brentano L. Genome sequencing analysis of Brazilian chicken

- anemia virus isolates that lack MSB-1 cell culture tropism. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2007 Mar [cited 2015 Feb 25];30(2):81–96. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147957106000919>
226. Giambrone J. Inmunosupresion en las aves: causas y prevencion. *Avic Prof (Santiago Chile)*. 1996;14(05):42–3, 45.
227. He X, Yang X, Guo Y. Effects of different dietary oil sources on immune function in cyclophosphamide immunosuppressed chickens,. *Anim Feed Sci Technol*. 2007;139(3–4, 15 December):186–200.
228. Sharma JM, I.J. Kim S, Rautenschlein HYY. Infectious bursa disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev Comp Immunol*,. 2000;24:223–35.
229. Markowski-Grimsrud CJ, Schat. KA. Infection with chicken anaemia virus impairs the generation of pathogen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Immunology*,. 2003;109:283–94.
230. Dong X, Ju S, Zhao P, Li Y, Meng F, Sun P, et al. Synergetic effects of subgroup J avian leukosis virus and reticuloendotheliosis virus co-infection on growth retardation and immunosuppression in SPF chickens. *Vet Microbiol* [Internet]. 2014 Aug 27 [cited 2015 Feb 20];172(3-4):425–31. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113514003174>
231. Cui. Z. Effect of multiple immunosuppressive viral infections on pathogenesis and epidemiology in chicken flocks. *Acta Vet Zootech Sin*. 2003;34:417–21.
232. Jiang S, Meng S, Cui Z, Tian F, Wang. Z. Epidemic investigation of co-infection of MDV, CAV and REV in spontaneous diseased chicken flocks in china. *Virolog Sin*. 2005;20:164–7.
233. Cui Z. Co-infection and interaction of immunosuppression viruses in flocks. *Chin J Anim Quar*,. 2007;24:45–8.
234. Y. Li, Z. Cui, S. Jiang, H. Guo. Synergic inhibitory effect of co-infection of CAV and REV on immune responses to vaccines in SPF chickens. *Chin J*

- Vet Sci. 2008;28:1243–6.
235. ICA. Sistema de Información y Vigilancia Epidemiológica. Colombia, Sanidad Animal 2008. Informe Técnico, Bogotá, DC. 2008;
 236. Valdivia. PESC. Isolation, Pathogenicity Study, Serotyping and Protection Study of Infectious Bursal Disease Virus National Strains. Chile.; 1997.
 237. Rautenschlein. S. Enfermedades inmunosupresoras de las aves: diagnóstico y control.. In: XVII Congreso de la Asociación Mundial de Veterinarios Avícolas, Cancún, México, agosto [Internet]. Disponible en línea el 07 febrero 2012 -; Available from: <http://www.elsitioavicola.com/articles/2101/enfermedades-inmunosupresoras-de-las-aves-diagnostico-y-control#sthash>
 238. Rosales AG, Villegas P, Lukert PD, Fletcher OJ, Mohamed MA, Brown. J. Isolation, identification and pathogenicity of two field strains of infectious bursal virus. *Avian Dis.* 1989;33:35–41.
 239. Rosales AG, P. Villegas PD, Lukert OJ, Fletcher MA, Mohamed JB. Pathogenicity of recent isolates of infectious bursal disease virus in specific pathogen free chickens: Protection conferred by an intermediate vaccine strain. *Avian Dis.* 1989;33:729–34.
 240. Nunoya T, Otaki Y, Tajima M, Hiraga M, Saito. T. Occurrence of acute infectious bursal disease with high mortality in Japan and pathogenicity of field in specific pathogen - free chickens. *Avian Dis.* 36.:597–607.
 241. Taminura N, Tsukamoto K, Nakanura K, Narita M, Maeda. M. Association between pathogenicity of infectious bursal disease virus and viral antigen distribution detected by immunohistochemistry. *Avian Dis.* 1995;39:9–20.
 242. Antioquia. G de. Datos Generales del Departamento [Internet]. Antioquia. República de Colombia. 2015. Available from: <http://antioquia.gov.co/>
 243. FAO. Wild Bird Highly Pathogenic Avian Influenza Surveillance sample collection from healthy, sick and dead birds. *Anim Prod Heal Food Agric Organ United Nations Rome.* 2006;
 244. Williams S. *Avian Histology Course.* University of Georgia. Poultry

- Diagnostic and Research Center. 2014.
245. Cheville N. Patología celular. 1a ed. Acribia. Zaragoza.; 1980.
 246. Estupiñan. GA. Como Funciona Y Cuales Son Las Características Del Sistema Inmune De Las Aves. [Internet]. Patología Aviar Uptc. Tunja, Boyaca, Colombia. Available from: <http://patologiaaviaruptc.blogspot.com/2006/11/como-funciona-y-cuales-son-las.html>
 247. Alejandro. HBM. Caracterización del desarrollo de la bolsa de Fabricio, Timo y Bazo en aves tipo Leghorn, libres de patógenos específicos (LPE). Universidad Austral de Chile.;
 248. Hodges RD. The histology of the fowl. Press A, editor. London.; 1978.
 249. PAYNE LN, POWELL. PC. The lymphoid system. The physiology and biochemistry of the fowl. 5. FREEMAN. BM, editor. London.: Academic Press.; 1984. 277-321 p.
 250. Dellman HD. Textbook of veterinary histology. 4th ed. Febirger. L&, editor. Philadelphia,;
 251. Salazar AB, Navarro JA, Martínez., Pallarés FJ. Citología Veterinaria. [Internet]. Universidad De Murcia, España. Curso abierto. 2010 [cited 2015 Jan 21]. Available from: <http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/citologia-e-histologia-veterinaria/material-de-clase-1/tema19-organos-linfoides-i.pdf>
 252. Grieve DB. Las causas y evaluación de la inmunosupresión. In: XII Congreso Latinoamericano de Avicultura, Ecuador. 1991.
 253. Wolfe HR, Sheridan SA, Bilstad NM, Johnson. MA. The growth of lymphoidal organs and the testes of chickens. Anat Rec. 142:485–93.
 254. Rosenberger JK. No Title. Vinel Updat. 1995;52(null):1.
 255. AMC. N. Correlación entre la línea base serológica , histopatología , imagen de bolsa , PCR y secuenciación viral para la enfermedad de Gumboro en fase de cría en ponedoras comerciales de una granja , municipio de Lebrija , Santander. Rev SPEI DOMUS. 2007;Diciembre(NÚMERO 6 - 7 / ABRIL).

256. O. R. Sistema inmune aviar. Estrategia de protección de las aves. Importancia de su buen funcionamiento. [Internet]. 2013 [cited 2013 Feb 2]. Available from: http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/dr._oscar_robin.pdf
257. Eterradossi N, Saif YM. Infectious bursal disease. In: Swayne DE (Ed. ., editor. Diseases of Poultry. Iowa: John Wiley and Sons, Inc.,; 2013. p. 219–31.
258. Rosenberger JK y SSC. Chicken anemia virus. Poult Sci. 77:1190–2.
259. Biarnés M, Blanco A, Jové QCR. Monitorización de la vacunación frente a la enfermedad de Marek mediante PCR en tiempo real a partir de pulpa de la pluma. (2011).
260. Nair V. Evolution of Marek's disease - A paradigm for incessant race between the pathogen and the host. Vet J. 2005;170:175–83.
261. Owen R. Control de la enfermedad de Marek y la Leucosis aviar. Ref para Consult MV. 2003;6:3–5.
262. Schat KA. Chicken Anemia Virus. In: de Villiers E-M, Hausen H, editors. TT Viruses SE - 10 [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 151–83. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-70972-5_10
263. Zhang YP, Liu CJ, Zhang F, Shi W, Li J. Sequence analysis of the meq gene in the predominant Marek's disease virus strains isolated in China during 2006-2008. Virus Genes. 2011;43(3):353–7.
264. Okonkwo C. An Outbreak of Marek's Disease in Adult Layer Chickens in Umuahia, Abia State, Nigeria. Annu Res Rev Biol [Internet]. 2015;7(3):200–5. Available from: <http://www.sciencedomain.org/abstract.php?iid=975&id=32&aid=9754>
265. Okwor EC, Eze DC. Outbreak and Persistence of Mareks Disease in Batches of Birds Reared in a Poultry Farm Located in Nsukka, South East Nigeria. Int J Poult Sci [Internet]. 2011;10(8):617–20. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=70125324&lang=es&site=ehost-live>
266. Carvallo FR, French RA, Risatti G. Mortality of One-Week-Old Chickens

- During Naturally Occurring Marek ' s Disease Virus Infection. *Vet Pathol.* 2011;48(5):993–8.
267. Gimeno I, Witter R, A MF, Silva R. Novel criteria for the diagnosis of Marek's disease virus-induced lymphomas. *Avian Pathol.* 2005;34(4):332–40.
268. Lawn AM, Payne LN. Chronological study of ultrastructural changes in the peripheral nerves in Marek's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* ENGLAND; 1979;5(6):485–97.
269. Dunn JR, Witter RL, Silva RF, Lee LF, Finlay J, Marker BA, et al. The effect of the time interval between exposures on the susceptibility of chickens to superinfection with Marek's disease virus. *Avian Dis. United States;* 2010 Sep;54(3):1038–49.
270. Kalyani IH, Joshi CG, Jhala CG, Bhanderi BB, Purohit JH. Characterization of 132 bp repeats BamH1-H region in pathogenic Marek's disease virus of poultry in Gujarat, India, using PCR and sequencing. *Indian J Virol.* 2011;22(1):72–5.
271. AM M, SM R, RW. M. Coinfection of specific-pathogen-free chickens with Marek's disease virus (MDV) and chicken infectious anemia virus: effect of MDV pathotype. *Avian Dis.* 2001;Jan-Mar(45(1)):9–18.
272. Xiu-guo D, Guo Z, Zi-qiang C, Gui-hua W, Xiang-kai M, Ting-ting G, et al. Dynamic Pathology and Antigen Location Study on Broiler Breeders with Coinfection of Marek's Disease Virus and Reticuloendotheliosis Virus. *Agric Sci China [Internet].* 2008 Nov [cited 2015 Apr 12];7(11):1387–93. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1671292708601893>
273. Gong Z, Zhang L, Wang J, Chen L, Shan H, Wang Z, et al. Isolation and analysis of a very virulent Marek's disease virus strain in China. *Viol J [Internet]. Virology Journal;* 2013;10(1):155. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3673820&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
274. Read AF, Baigent SJ, Powers C, Kgosana LB, Blackwell L, Smith LP, et

- al. Imperfect Vaccination Can Enhance the Transmission of Highly Virulent Pathogens. PLoS Biol [Internet]. Public Library of Science; 2015 Jul 27;13(7):e1002198. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pbio.1002198>
275. Otaki Y, Nunoya T, Tajima M, Nomura Y. Isolation of chicken anaemia agent and Marek's disease virus from chickens vaccinated with turkey herpesvirus and lesions induced in chicks by inoculating both agents. *Avian Pathol.* 1987;16:291_306.
276. Jones D, Brunovskis P, Witter R, Kung HJ. Retroviral insertional activation in a herpesvirus: transcriptional activation of US genes by an integrated long terminal repeat in a Marek's disease virus clone. *J Virol.* 1996;70(4):2460–7.
277. Yu Z-H, Teng M, Luo J, Wang X-W, Ding K, Yu L-L, et al. Molecular characteristics and evolutionary analysis of field Marek's disease virus prevalent in vaccinated chicken flocks in recent years in China. *Virus Genes.* 2013;47(2):pp 282–91.
278. Schat KA. Isolation of Marek ' s disease virus : revisited Isolation of Marek ' s disease virus : revisited. *Avian Pathol.* 2016;9457(January).
279. Watif AI, Eisa S, Kheir M, M AA. Marek's Disease in the Sudan: Isolation in Tissue Culture and Cytopathological Features. *Sudan J Vet Res.* 2001;17.
280. Shahzad MK, Majeed KA, Younus M. Marek ' s Disease : A Mini-Review. 2007;1:4–8.
274. Zhang, Xinheng et al. "Phylogenetic and Molecular Characterization of Chicken Anemia Virus in Southern China from 2011 to 2012." *Scientific Reports* 3 (2013): 3519. PMC. Web. 9 Nov. 2015.
275. AboElkhair, Mohammed, Alaa G. Abd El-Razak, and Abd Elnaby Y. Metwally. "Molecular Characterization of Chicken Anemia Virus Circulating

in Chicken Flocks in Egypt.” *Advances in Virology* 2014 (2014): 797151.
PMC. Web. 9 Nov. 2015.

276. Craig MI, Rimondi A, Delamer M, Sansalone P, König G, Vagnozzi A, Pereda A. Molecular Characterization of Chicken Infectious Anemia Virus Circulating in Argentina During 2007. *Avian Dis.* 2009 Sep; 53(3):331-5.