

**UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE VETERINARIA**

**DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICO DE LEUCOSIS AVIAR EN
REPRODUCTORAS PESADAS EN GUATEMALA**

TESIS

**PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE
LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

POR:

RAMIRO BAILEY BELTETON

AL CONFERIRSE EL TITULO ACADEMICO DE

MEDICO VETERINARIO

Guatemala, Octubre 1999

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

**Cumpliendo con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos
de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de tesis
Titulado:**

**DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICO DE LEUCOSIS AVIAR EN
REPRODUCTORAS PESADAS EN GUATEMALA**

**Que me fuera aprobado pr la Junta Directiva de la Facultad de
Medicina Veterinaria y Zootecnia
Previo a optar el título de:**

MEDICO VETERINARIO

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO: Lic. RODOLFO CHANG

SECRETARIO: Dr. M.V. MIGUEL ANGEL AZAÑON

VOCAL I: Lic. ROMULO GRAMAJO

VOCAL II: Dr. M.V. FREDY GONZÁLEZ

VOCAL III: Lic. EDUARDO SPIEGELER

VOCAL IV: Br. JEAN PAUL RIVERA

VOCAL V: Br. FREDY CALVILLO

ASESORES:

Dr. EDGAR ROLANDO PAIZ C.
Dra. BEATRIZ SANTIZO
Dr. MANUEL HOFFMAN Q.

ACTO QUE DEDICO

A DIOS

A MIS PADRES: **AUGUSTO BAILEY SOLÁ Y (Q.E.P.D.)**
MARIA LUISA DE BAILEY (Q. E. P. D)

A MI ESPOSA: **ANA IZABEL DE BAILEY**

A MIS HIJOS: **KARLA SUSANA**
PABLO RAMIRO
MARCO ANTONIO

A MIS HERMANOS: **RUBEN, ALICIA, JAVIER,**
LETICIA, ESTELA

A MIS AMIGOS: **DR. PABLO GIRON M.**
DR. ALFREDO PORTA V.
SR. VÍCTOR HERNANDEZ

TESIS QUE DEDICO

A MI PATRIA GUATEMALA

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

A MIS ASESORES

**DR. EDGAR ROLANDO PAIZ C.
DR. MANUEL HOFFMAN
DRA. BEATRIZ SANTIZO**

AGRADECIMIENTO

**AL DR. MANUEL ENRIQUE HOFFMAN QUIROZ. POR SU
DESINTERESADO E INCONDICIONAL APOYO PARA LA
REALIZACION DE ESTE TRABAJO.**

INDICE

	PAGINA	
I	Introducción	1
II	Hipótesis	2
III	Objetivos	3
IV	Revisión de Literatura	4
	4.1 Características Biológicas	4
	4.2 Propiedades Antigénicas	5
	4.3 Epidemiología	6
	4.4 Diagnóstico	8
	4.5 Prevención y Control	10
	4.6 Prácticas de Manejo para Minimizar El Riesgo de Leucosis	10
	4.7 Enfermedades predisponentes	11
	4.8 Manejos	12
V	Materiales	13
VI	Método	14
	6.1 Técnica Histológicas	14
	6.2 Materiales	14
	6.3 Equipo de Laboratorio	15
	6.3.1 Obtención de Muestras y Fijación	15
	6.3.2 Fijación	16
	6.3.2.1 Fijadores	17
	6.3.3 Inclusión	18
	6.3.4 Tinción	20
VII	Resultados	21
	7.1 Descripción de la Leucosis Aviar en Reproductoras Pesadas de Guatemala	21
	7.1.1 Sintomatología	21
	7.1.2 Descripción de Lesiones	21
	7.1.3 Lesiones Microscópicas	22

VIII	Conclusiones	24
IX	Recomendaciones	25
X	Resumen	26
XI	Bibliografía	27

I INTRODUCCION

La Leucosis aviar es una de las entidades patológicas que durante muchos años ha sido conocida por los avicultores. (2,3,4,7,11, 14,16,18.) El grupo de enfermedades Leucosis/sarcomas aviaries está representada por una variedad de tumores causados por varios virus, relacionados del género Retrovirus y la familia Retroviridae (3,4,11,15,18.) Esta es una enfermedad diferente a Marek que también causa tumores, pero ésta tiene como agente causal a un herpesvirus. Ambas enfermedades son conocidas y han sido estudiadas desde hace muchas décadas. En el pasado, la edad de la ocurrencia de la enfermedad, era el principal criterio para la diferenciación entre los tumores provocados por los virus de estas dos patologías. Los tumores de Leucosis aviar, solamente eran encontrados en aves después de las 14 semanas de edad. (4)

La presencia de tumores en vísceras en aves más jóvenes así como las lesiones de los nervios periféricos, eran suficientes para un diagnóstico positivo de enfermedad de Marek. (2,3,4,7,11,15,17,18,19.)

La Leucosis aviar afectaba más a las líneas de aves de postura como la White Leghorn que a las reproductoras pesadas, que eran más resistentes. (1,2,3,4,5,.) En las aves livianas el virus de Leucosis era tan diseminado que no se encontraban aves libres de virus exógenos. En la década del 60, la mortalidad de ponedoras por ésta enfermedad fué tan elevada que los criadores alojaban 10% y hasta 25% más de pollitas a la capacidad del espacio en piso de las galeras, tomando en cuenta las pérdidas futuras. (1) En 1970, algunas empresas de genética iniciaron programas de erradicación de los virus de Leucosis aviar, acreditándose en pocos años, a la mayoría de las ponedoras blancas su certificación de origen de plantales libres de virus. No se tenía información precisa sobre el nivel o presencia de virus de Leucosis en reproductoras pesadas. (4).

La epidemiología tanto de Marek como de Leucosis, ha variado en los últimos años y las referencias de acuerdo a la edad no son tan indicativas como en el pasado. (4).



III OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Dar a conocer la existencia de la enfermedad, en las explotaciones avícolas, para que los importadores tomen algunas medidas que los ayuden a minimizar el problema en las granjas de reproductoras.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Utilizar y resaltar la importancia del uso de la Histopatología como instrumento básico de orientación diagnóstica.

IV REVISION DE LITERATURA

El grupo de enfermedades Leucosis/Sarcomas aviar está representada por una variedad de tumores causados por varios virus relacionados entre ellos del género Retrovirus perteneciente a la Familia Retroviridae. Algunos de éstos virus causan la Leucosis Linfoide caracterizada por tumores de células "B" (de la bolsa de fabricio), que es la patología tumoral provocada por Retrovirus más común. Los virus de la Leucosis aviar poseen una cápsula protéica, codificada por el gen gag, que incluye el mayor antígeno específico del grupo (GSA). La detección GSA constituye la base de muchas pruebas de diagnóstico. El virión encapsulado posee una envoltura más extensa codificada por un gen env. Este virión también posee una enzima única conocida como reverso transcriptasa (de donde deriva el nombre de la familia), codificada por el gen pol, la cual produce un provirus ADN que se integra con el ADN del huésped. Esto permite la transcripción de ARN viral para que se puedan reproducir las proteínas virales. Estos nuevos virus se ensamblan y emergen a través de la membrana plasmática al exterior de la célula. (1,3,7,9,14.)

4.1 Características Biológicas

Variadas cepas de laboratorio de los virus de la Leucosis/Sarcoma aviar (ALVs) son genéticamente defectivos ya que carecen del gen env que se requiere para producir la envoltura viral y por lo tanto, no se puede replicar a menos que sean ayudados por otros virus ALV no defectivos (virus auxiliar). (3).

Muchos virus defectivos tienen una capacidad transformante (inducción de tumores) aguda sobre las células. Estos virus poseen genes onc (oncogenes) que codifican proteínas asociadas a la transformación (ó tumoración). Los virus no defectivos no poseen oncogenes y son de dos tipos: los virus exógenos ALV comunes, presentes en el campo y varias clases de virus ALV endógenos ó genes (tales como el lci eV y los elementos EAV y ART) que están integrados al genoma normal de las aves. Los virus exógenos ALVs pueden tener una capacidad transformante, lenta incluyendo aquellos que causan la Leucosis Linfoide.

Estos virus pueden transformar células al activar un oncogen del genoma del hospedador. Generalmente, éste es el resultado de una integración de ADN viral a muchos sitios del genoma del pollo, de los cuales uno activa el oncogen en muchos sitios del genoma del pollo, de los cuales uno activa el encogen en una de las células del hospedador y promueve la proliferación de esa célula en particular como clon celular. Los virus ALV exógenos se transmiten de manera vertical y horizontal. El genoma del pollo contiene muchos elementos endógenos semejantes a ALV o loci endógeno. La función biológica de los elementos endógenos aún no se comprende. Se cree que estos elementos se pueden haber introducido por la infección con virus exógenos a través de diferentes etapas de evolución de las especies. Los virus ALV endógenos no tienen ninguno o poco potencial de transformación (oncogénesis). Estos elementos se heredan en un patrón Mendeliano normal. (3).

4.2 Propiedades antigénicas/subgrupos

Los virus ALV que se presentan en los pollos se han dividido en 6 Subgrupos basándose en la Glicoproteína (gp 85) de la envoltura identificada por pruebas de Seroneutralización viral. (2). Los virus de los Subgrupos A y B son los virus exógenos que se encuentran más comúnmente en el campo. Ellos dan origen a tumores derivados de las células de la Bursa (por ejemplo, Leucosis Linfoide). Los virus de los Grupos C y D rara vez se han reportado en el campo. El Subgrupo E incluye a virus ALV endógenos uvcuitarios que se encuentran presentes en prácticamente todos los pollos normales. Recientemente se ha reportado el aislamiento de un nuevo Subgrupo J de virus ALV exógeno en reproductoras pesadas. Se ha logrado obtener una secuencia del genoma de una cepa prototipo del Subgrupo J del virus ALV. Este virus tiene los genes gag y pol con un alto grado de homología con otros Subgrupos. El gen env de éste virus muestra de 96 a 75% de homología con el gen env y el gen env like de la clase EAV de ALVs endógenos. Estos hallazgos sugieren que este nuevo virus J es un recombinante de las secuencias EAV endógenas y ALV exógenas. (1,3,7,9,14.)

El prototipo de Subgrupo J de virus ALV tiene tropismo por células de la serie mielomonocítica (médula ósea) y bajo tropismo por células de la Bursa, por lo tanto provoca Leucosis mioelode en vez de Leucosis linfoide. Las células de por lo menos 11 líneas de pollos, jungle fowl y pavos parecen ser susceptibles a éste virus. En condiciones de campo, la infección se presenta como tumores sobre el interior del esternón, en vértebras y costillas y también como infiltraciones en el hígado, bazo y riñones. El análisis histopatológico identifica estos tumores como mielocitomas. Ocasionalmente se presentan en el campo tumores de blastocitos y sarcomas de histiocíticos. Este virus, al igual que los otros virus ALV exógenos no poseen un oncogén viral. Las células infectadas se transforman (dando lugar al desarrollo de tumores) indirectamente por la activación de un oncogén celular del hospedador. También de manera adicional, estudios de secuencias en aislamientos de campo se han observado la presencia de diferencias moleculares sustituciones de nucleótidos. Estos resultados demuestran variación genética y antigénica entre los virus ALV del Subgrupo J. (1, 2, 5, 11,12,13.)

4.3 Epidemiología

Los virus ALV exógenos son ubicuitarios en reproductoras pesadas. Normalmente unas pocas aves se infectan de manera vertical con ALV exógeno y el resto se infectan por vía horizontal durante la crianza, por contacto con las aves infectadas. La infección no se disemina rápidamente por contacto indirecto, por ejemplo, entre aves separadas por corrales o en jaulas, probablemente esto se deba a la rápida pérdida de infectividad del virus cuando se encuentra fuera del ave. La infección vertical ocurre a partir de gallinas infectadas con virus ALV exógeno que desde el oviducto contaminan la albúmina, de allí pasa el embrión y posteriormente al pollito eclosionado. En el macho, el virus está presente en todo el tracto reproductivo y se puede detectar en el semen. Sin embargo, aunque al parecer los pollitos no se infectan a partir del macho, una hembra sana puede ser infectada por vía venérea. Los pollitos infectados por vía congénita a ALV y después del nacimiento son virémicos y no desarrollan anticuerpos neutralizantes. A su vez, las gallinas infectadas por vía congénita contienen virus en el oviducto y transmiten el virus regularmente a la mayoría de los huevos fértiles y a muchos de sus pollitos. La infección de la albúmina no siempre ocurre en un embrión infectado. (3).

Los pollos infectados horizontalmente durante la crianza, presentan una viremia transitoria y posteriormente, desarrollan anticuerpos neutralizantes. Las hembras infectadas de ésta manera presentan el virus en el oviducto en una proporción mucho menor y lo diseminan a su progenie en forma intermitente.

Consecuentemente hay cuatro tipos serológicos de pollos en las poblaciones infectadas. (3)

1. Sin viremia, sin anticuerpos, sin diseminación (V-,A-,S-).
- 2.- Con viremia sin anticuerpos, con diseminación (V+,A-,S+).
- 3 Sin viremia, con anticuerpos, sin diseminación (V-,A+,S-).
- 4.- Pocos con viremia, con anticuerpos, diseminación ocasional (V±.A+, S±)

En una parvada infectada, una fracción (generalmente inferior a 10%) son V+, A- y la mayoría son V-,A+ (Figura 2). En general, la resistencia al desarrollo de tumores aumenta rápidamente, después de las primeras semanas de vida y las hembras son más susceptibles que los machos. La inmunodepresión provocada por desafíos a otras enfermedades parece incrementar la proporción de pérdidas atribuidas a los virus ALV. Esto probablemente se debe a un incremento en la susceptibilidad a los efectos del virus, y pudieran resultar también mayores tasas de eliminación de virus.

4.4 Diagnóstico

El diagnóstico de la infección por ALV-J se realiza por medio de la identificación patológica del tipo de tumor y la identificación virológica del virus. Los mielocitomas tienen un aspecto macro y microscópico característicos 3,4,11,14,18. Se presentan frecuentemente sobre la superficie de huesos tales como las uniones costocondrales de las costillas y sobre el esternón, la pelvis, la mandíbula y el cráneo. Estos tumores suelen ser nodulares o más difusos, generalmente múltiples, suaves y friables de color blanco amarillento. También se puede encontrar tumores en los órganos viscerales. Generalmente ocurre la infiltración y crecimiento del hígado, bazo y riñones. También es posible llevar a cabo un diagnóstico por examen microscópico, sin embargo, se requiere de gran experiencia pues diferenciar mielocitomatosis de mieloblastosis, la Leucosis linfoide y de la Enfermedad de Marek. La morfología de las células tumorales se pueden verificar más fácilmente en cortes ó secciones teñidas con Romanowsky o May Grunwald-Giemsa, que con Hematoxilina-Eosina. Los tumores consisten de masas sólidas de mielocitos maduros uniformemente diferenciados, cuyo citoplasma está lleno de numerosos gránulos acidofílicos redondos (3,4,11,14,18.)

El siguiente conjunto de tejidos son los recomendados para el diagnóstico de enfermedades causadas por ALSV y otros tumores: hígado, bazo, bolsa de Fabricio, timo, médula ósea, gónadas, nervio ciático, braquial y mesentérico y cualquier otro tejido tumoral. Es imprescindible realizar un diagnóstico diferencial y/o establecer la presencia simultánea de otras enfermedades tumorales. Es frecuente encontrar parvadas que presentan tumores causados por más de un agente. De hecho, los laboratorios especializados utilizan marcadores de células "T" y células "B" para establecer el tipo de tumor.

Para aislamiento viral, las mejores muestras son plasma, suero y linfocitos de sangre periférica. Los virus también se pueden encontrar en heces, albúmina de huevo fresco, huevos embrionados de gallinas que están transmitiendo el virus verticalmente, en pulpa de pluma y semen. Estas muestras se inoculan en cultivos celulares (fibroblastos) genéticamente resistentes al Subgrupo E del virus ALV. Siete a nueve días después, por medio de la prueba ELISA, se busca

la presencia de p27 (GSA). También es posible detectar directamente p27 utilizando pruebas ELISA en meconio, albumen é hisopos cloacales, sin embargo, en muchos casos es difícil diferenciar la expresión GSA de las reacciones positivas del virus ALV endógeno de las reacciones provocadas por la presencia de la infección ALV exógena.

Debido a que los ALSV son ubicuos en todas las parvadas comerciales, su aislamiento, incluso de tejido tumoral, no necesariamente es una prueba concluyente de que éstos son la causa del tumor. Para establecer el rol de un virus en cierto tipo particular de tumor, se requiere de la caracterización molecular del tumor ó la reproducción del tumor por transmisión experimental. También, las pruebas Viroológicas frecuentemente demuestran que las vacunas de virus vivo (propagadas en embrión de pollo ó cultivos celulares) estarán libres de ALSV.

Los anticuerpos contra los ALV exógenos se pueden detectar por medio de pruebas de neutralización en cultivos celulares y por pruebas de ELISA. A pesar de que a nivel de parvada los resultados son similares, a nivel individual la correlación entre las dos pruebas de baja, probablemente debido a la detección de epitopos diferentes. Aún más, está comprobado que el suero no es una muestra adecuada para la detección de ALV exógeno por ELISA. Por el momento, no hay pruebas de ELISA disponibles comercialmente para la detección de ALV-J. Las pruebas diseñadas para detectar anticuerpos de los Subgrupos A y B no detectan los anticuerpos de ALV-J. Actualmente se utilizan en forma creciente la detección de ácidos nucleicos virales por análisis de Hibridización (Inmunoblot), y la reacción en cadena de polimerasa (PCR) para detectar el virus en varios tipos de tejidos. No obstante, la precisión y especificidad de estas pruebas no está todavía establecida. A pesar de todas las herramientas de diagnóstico disponibles actualmente es poco probable que una sola prueba pueda ser utilizada para detectar a todas las aves infectadas (3)

4.5 Prevención y Control

Actualmente, no existen medicamentos ni vacunas disponibles para proteger a las aves contra los efectos de los virus ALV. Tampoco se ha logrado identificar resistencia genética a la infección con el Subgrupo J en reproductoras pesadas. La erradicación de la infección ALV exógenos es posible en poblaciones de elite utilizando los métodos de detección mencionados previamente. Estos Protocolos de diagnóstico y erradicación de ALV son largos, complejos y costosos. Básicamente, consisten en la eliminación de la transmisión vertical del virus desde las reproductoras infectadas hacia su progenie. Las aves seleccionadas para producir la siguiente generación deben estar libres de virus, al nacer, criarse y permanecer en condiciones de estricto aislamiento y bioseguridad, para evitar toda posible exposición y/o infección. Bajo condiciones comerciales, el control se debe basar en la utilización de prácticas de manejo y bioseguridad que ayuden a reducir el riesgo de infección a nivel de reproductores. (3,4,11,18.).

4.6 Prácticas de manejo para minimizar el riesgo de Leucosis Mieloide

Bajo condiciones de campo, una serie de enfermedades y factores de manejo pueden influenciar el impacto de virus ALV-J en reproductoras pesadas. En la mayoría de los casos, la presencia de este virus puede tener poco o ningún impacto sobre la condición sanitaria y de productividad de la parvada. Sin embargo, el desarrollo de tumores en las aves afectadas significa un deterioro gradual de su condición y posterior muerte. Aún no está claro si el virus ALV-J afecta la producción de huevos. Las siguientes técnicas de prevención de enfermedades reducen el riesgo de desarrollo de tumores y pérdidas asociadas, ya sea a las infecciones verticales u horizontales del virus ALV-J. (3)

4.7 Enfermedades predisponentes

1. Virus de la enfermedad de Marek (MDV). La Leucosis mieloide es más frecuente en las aves donde el control de MDV ha fallado, ya sea debido a una exposición temprana a un desafío de campo y/o a un desafío con tipos patogénicos altamente virulentos e inmunosupresores de MDV (ejemplo: vvMDV+). Esta situación se puede mejorar con el uso de cepas vacunales o combinaciones de vacunas más efectivas, en conjunto con adecuadas medidas de higiene y desinfección de la granja: BIOSEGURIDAD. (3)
2. Virus de la Reticuloendoteliosis (REV). Una interacción similar con REV puede llevar a una mayor incidencia de tumores. Es de especial importancia la condición de que las vacunas vivas propagadas en embriones pollo ó en cultivos celulares estén libres de REV. (3)
3. Otros agentes inmunosupresores. Varios agentes pueden deteriorar la capacidad de las aves de presentar una respuesta inmune adecuada frente al desafío del virus ALV-J. Los Reovirus, la Enfermedades Infecciosa de la Bolsa (IBD), el virus de la Anemia Aviar (CAV) y las Micotoxinas son algunos de los más comunes. Otras posibles mejoras son (a) aumentar la inmunidad materna, (b) reducir o retrasar el desafío de campo utilizando buenas prácticas de Bioseguridad, (c) utilizando vacunaciones apropiadas y oportunas, y (d) asegurando y monitoreando la calidad del alimento.

La importancia de la higiene y desinfección en la granja es un tópico recurrente. Como se especificó anteriormente, son varios los agentes que por si solos, o en combinación, pueden dañar tempranamente el sistema inmune del ave y llevar a un incremento en la susceptibilidad y severidad de las infecciones ALV-J. El colocar a reproductores de un día en galpones contaminados, por ejemplo con reuso de cama, asegura el desafío a una amplia gama de patógenos aviares incluyendo el virus de ALV-J. (3)

4.8 Manejos

1. Separar los sexos. Durante la crianza mantenga las poblaciones de machos y hembras separadas hasta el momento de la transferencia o hasta el apareamiento. Si esto no es posible, al menos mantenga las hembras separadas de los machos hasta las 6 semanas de edad

Esto reducirá el estrés de la competencia entre sexos y disminuirá la posibilidad de transmisión horizontal del virus. (3)

2. Está comprobado que el virus ALV-J se puede transmitir a través de agujas contaminadas. Por lo tanto, en las vacunaciones se debe cambiar las agujas para machos y hembras mientras se estén criando separados. (3)
3. Peso y nutrición. El mantener la parvada en la curva de peso recomendada, así como proporcionar los niveles nutricionales correspondientes, asegura un crecimiento uniforme y un adecuado desarrollo del Sistema Inmune. Las primeras seis semanas de vida son críticas para maximizar la habilidad de las aves para afrontar los desafíos de ALV-J y otras enfermedades. (3)
4. Densidad poblacional y espacio de comedero. El estrés es una causa importante de inmunosupresión, disminuye el rendimiento e incrementa la susceptibilidad a enfermedades. Para minimizar el estrés es esencial que las aves tengan fácil acceso al agua y nutrientes y apoyar así un crecimiento y desarrollo adecuados, viabilidad, reproducción incubabilidad y calidad sanitaria de los pollitos producidos. (3)
5. Proporción machos/hembras. Un exceso de machos ocasiona estrés para ambos sexos. La agresividad y el estrés aumentan cuando los machos deben competir por espacio de comedero. Los machos generalmente dominantes, se tornan extremadamente agresivos con los subordinados, si están frustrados y hambrientos. Es más, los efectos hormonales asociados con la madurez sexual pueden exacerbar el comportamiento agresivo en las parvadas con exceso de machos. Una acción oportuna para controlar el número de machos reduce este tipo de estrés (3).

V MATERIALES

5.1 Materiales

5.1.1 Recursos Humanos

En las granjas avícolas se recurrió a los Médicos Veterinarios encargados y al estudiante a quienes se les proporcionarán frascos estériles con formaldehído tamponado al 10%, a fin de poder tomar las muestras de tejidos y órganos adecuadas para su estudio posterior por Histopatología.

5.1.2 En la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia se contó con la asesoría directa del doctor Edgar Rolando Paiz, en los estudios de Histopatología.

Así como la asesoría de la doctora Beatriz Santizo para la descripción macroscópica de las lesiones, y asesoría general.

5.1.3 Transporte: Se utilizarón recursos propios para el transporte de las muestras de tejidos al Laboratorio.

5.1.4 Centros de Referencia: Biblioteca de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Internet, Biblioteca del INCAP, Asociación Nacional de Avicultores de Guatemala (ANAVI) y sus Asesores Técnicos Dres. Edgar Bailey y Manuel Hoffman

VI METODO

Las muestras fueron recolectadas de acuerdo al protocolo correspondiente en las granjas y fijadas con formaldehído tamponado al 10%.

Se utilizó el método convencional de histopatología con cortes teñidos con hematoxilina-Eosina, para el análisis microscópico.

6.1 TECNICA HISTOLOGICA

La técnica Histológica comprende la preparación de los tejidos para su estudio al microscopio de luz, lo cual se logra sometiendo a la totalidad o a una parte seleccionada del tejido a una serie de procesos:

- ❖ Fijación
- ❖ Deshidratación
- ❖ Aclaramiento
- ❖ Inclusión
- ❖ Corte
- ❖ Tinción

6.2 MATERIALES

- a)** Formol al 10% neutralizado
- b)** Alcohol isopropílico
- c)** Xilol
- d)** Parafina
- e)** Colorantes: Hematoxilina y Eosina
- f)** Permunt o Merckoglass
- g)** Gelatina
- h)** Acído fórmico

6.3 EQUIPO DE LABORATORIO

- a) Baño de María
- b) Mechero
- c) Horno
- d) Autotecnicón o procesador de tejidos
- e) Centro de Inclusión
- f) Espátulas y pinzas
- g) Láminas porta objetos
- h) Láminillas cubre objetos
- i) Micrótopo
- j) Batería de coloración

6.3.1 OBTENCION DE MUESTRAS Y FIJACION:

La recolección de material puede hacerse de animales encontrados muertos (dependiendo del tiempo de su muerte) y de animales sacrificados en el laboratorio, ya sea por desarticulación cervical, sangría narcotización o shock eléctrico. Es preferible que el examen Necrópsico sea realizado inmediatamente después de la muerte. Si es inevitable el retraso el cadáver debe ser colocado en refrigerador a 4 grados centígrados ó sometido a embalsamiento por vía arterial.

Para la recolección de material deben respetarse las siguientes normas:

- a) Seleccionar adecuadamente las muestras de modo que sea representativa (del padecimiento)
- b) Las muestras deben ser tomadas lo más rápidamente posible después que el animal ha muerto.
- c) Toda muestra debe ser debidamente identificada.

6.3.2 FIJACION

En cuanto se extirpa un tejido del organismo animal se priva de su irrigación, empieza a descomponerse o a cambiar su morfología siendo una causa la falta de oxígeno, la acumulación de bióxido de carbono y otros productos sobre el metabolismo celular y de acción de diversas enzimas (autólisis).

Este mismo proceso empieza en todos los tejidos en cuanto se produce la muerte, y la rapidez de la descomposición en los tejidos.

Así pues, para preservar el estado natural de las células de los tejidos, es indispensable detener cuanto antes este proceso de descomposición en los tejidos.

Para este propósito, debe colocarse el tejido en un volúmen adecuado de una solución fijadora, lo más pronto posible después de la obtención de la pieza del organismo animal.

La fijación es el proceso mediante el cual los elementos constitutivos de las células, y por tanto de los tejidos, son fijados en cuanto a su estado físico, y parcialmente también, en su estado químico, de manera que puedan resistir el tratamiento sucesivo con varios reactivos sin pérdida, distorsión importante o descomposición, la mayoría de los agentes fijadores actúan desnaturalizando o precipitando las proteínas, que forman entonces una esponja o malla que tiende a englobar los otros componentes.

En condiciones ideales, un fijador debe penetrar rápidamente al tejido, su acción debe ser inmediata, y debe causar una pérdida y una alteración química y física mínima de la células y de sus componentes; debe además, ser barato, estable y de fácil manejo.

En principios generales de Manejo y Fijación de las muestras la cantidad de líquido fijador debe ser aproximadamente 10-20 veces el volúmen de la muestra, excepto cuando se utiliza tetraóxido de osmio, que es caro. Se debe tener en cuenta que no hay ningún fijador ideal y la elección depende del tipo de células o de tejido que se desee estudiar, teniendo presente las posibles tinciones posteriores.

6.3.2.1 FIJADORES:

a) Formol al 10% neutralizado (fijador de rutina):

Ha sido neutralizado con fosfatos para alcanzar un ph de 6.8, tiene la ventaja de que es económico, fácil de preparar, relativamente estable y permite el empleo ulterior de numerosas funciones, penetra bien en los tejidos y no los hace duros ni quebradizos.

El tiempo de fijación depende del tamaño de la pieza y oscila entre 12-24 horas.

- DESHIDRATACION Y ACLARAMIENTO DEL TEJIDO

Los tejidos contienen grandes cantidades de agua tanto intra como extracelular, que debe ser eliminada y reemplazada por parafina, a este proceso se le denomina deshidratación.

Tanto la deshidratación como el Aclaramiento se realizan en el autotecnicón utilizando diferente soluciones o reactivos como formol neutralizado, alcohol isopropílico (se mezcla bien con el agua para eliminarla), xilol (soluble en alcohol y afinidad con la parafina) y parafina fundida.

El tiempo de recorrido es de 12 horas y se hace de la siguiente forma:

- REHIDRATACION

▪ Formol	1 hora
neutralizado.....	1 hora 2 recipientes
▪ Formol	1 hora
neutralizado.....	1 hora
▪ Alcohol	1 hora 5 recipientes
isopropílico.....	1 hora
▪ Alcohol	1 hora
isopropílico.....	

- **ACLARAMIENTO (DESALCOHOLIZACION) :**

- Xilol..... 1 hora
- 1 hora 3 recipientes
- Xilol..... 1 hora
- 1 hora 2 recipientes
- Xilol..... 1 hora

6.3.3 INCLUSION

Este proceso comprende la impregnación de los tejidos con un medio que llene todas las cavidades naturales extra e intercélular, y que proporcione la consistencia firme necesaria para hacer cortes bastante delgados sin provocar distorsión y sin alterar las relaciones espaciales del tejido y los elementos celulares.

La inclusión la realizamos en el aparato de inclusión, éste se compone de un recipiente que contiene parafina a 60 grados centígrados y una plancha fría. Después de haber concluido el proceso en el autotecnicón se incluyen los pequeños trozos de tejido en parafina fundida, formando pequeños bloques.

Para realizar este proceso utilizamos moldes ya sea de plástico o papel parafinado (existen moldes hechos).

Dentro del molde, antes de echar parafina, se coloca la pieza tisular poniendo hacia abajo el lado perforado y se llena con parafina, luego el conjunto se enfría sobre la plancha fría. Cuando este conjunto se ha endurecido, es retirado de la plancha fría, se anota el número y se desecha el molde y se procede a cortarlo en cubo y se elimina el exceso de parafina.

Los soportes para bloques o tejidos son de madera, para fijarlo a éste se calienta una espátula plana de hoja ancha en la llama de un mechero de Bunsen; y se coloca el fondo del bloque de parafina sobre la espátula y en cuanto se derrita se desliza sobre la superficie cerrada del bloque de madera, teniendo cuidado de que los lados del bloque de parafina sean paralelos a los del bloque de madera, se presiona el bloque de cera firmemente hacia abajo y se deja endurecer.

- **CORTE EN MICROTOMO**

Micrótomo, máquina construida para obtener láminas muy delgadas de tejidos. Existen varias clases de micrótomos, por ejemplo:

1. De deslizamiento
2. Rotatorio
3. De balanceo
4. De congelación
5. Para cortes ultradelgados que se usan en microscopía electrónica

Estas máquinas utilizan un juego de cuchillas, de las cuales, las más utilizadas en la actualidad son los de filo de cuña.

El cubo de parafina con soporte de madera se coloca en el micrótomo y se procede a calcular el corte. El corte recomendado debe hacerse de 4-5 micras de grosor, luego, con una pinza se obtienen las piezas cortadas y se dejan flotar en el Baño de María, que debe estar 60 grados centígrados conteniendo agua y gelatina. Después se recogen con portaobjetos, ya adheridos a éste, se llevan al horno que debe estar a 60 grados centígrados y se dejan durante un mínimo de 30 minutos para el secado.

6.3.4 TINCIÓN

Para poder colorear los cortes con hematoxilina eosina se procede de la manera siguiente:

DESPARAFINACION: Esto consiste en que antes de colorear debe eliminarse la parafina con una sustancia que la disuelva y para esto el xilol es indicado.

- a) Desparafinar los cortes con 3 recipientes con xilol, 5 minutos en cada uno.
- b) Pasarlos después en 3 recipientes con alcohol isopropílico, cinco minutos en cada uno.
- c) Lavar con agua corriente para hidratación 5 minutos.
- d) Colorear con hematoxilina 5 minutos.
- e) Lavar rápidamente con agua corriente.
- f) Sumergir los cortes una vez en alcohol ácido (alcohol isopropílico al 80% con 1 cc. De ácido clorhídrico por cada 100 cc de alcohol al 80%) para diferenciar.
- g) Lavar con agua corriente durante 10 minutos para azulear los cortes
- h) Sumergir por un minuto en Eosina al 5%.
- i) Lavar rápidamente con agua corriente.
- j) Deshidratar con 3 baños de alcohol isopropílico, pocas sumergidas
- k) Aclarar con 2 baños de xilol pocas sumergidas.
- l) Montar los cortes con Pemount, Merckoglass, Bálsamo de Canadá, etc.
- m) Con la coloración de H. E. El núcleo se colorea azul y el citoplasma en rosado.

VII RESULTADOS

7.1 DESCRIPCION DE LA LEUCOSIS AVIAR EN REPRODUCTORAS PESADAS DE GUATEMALA

7.1.1 SINTOMATOLOGIA

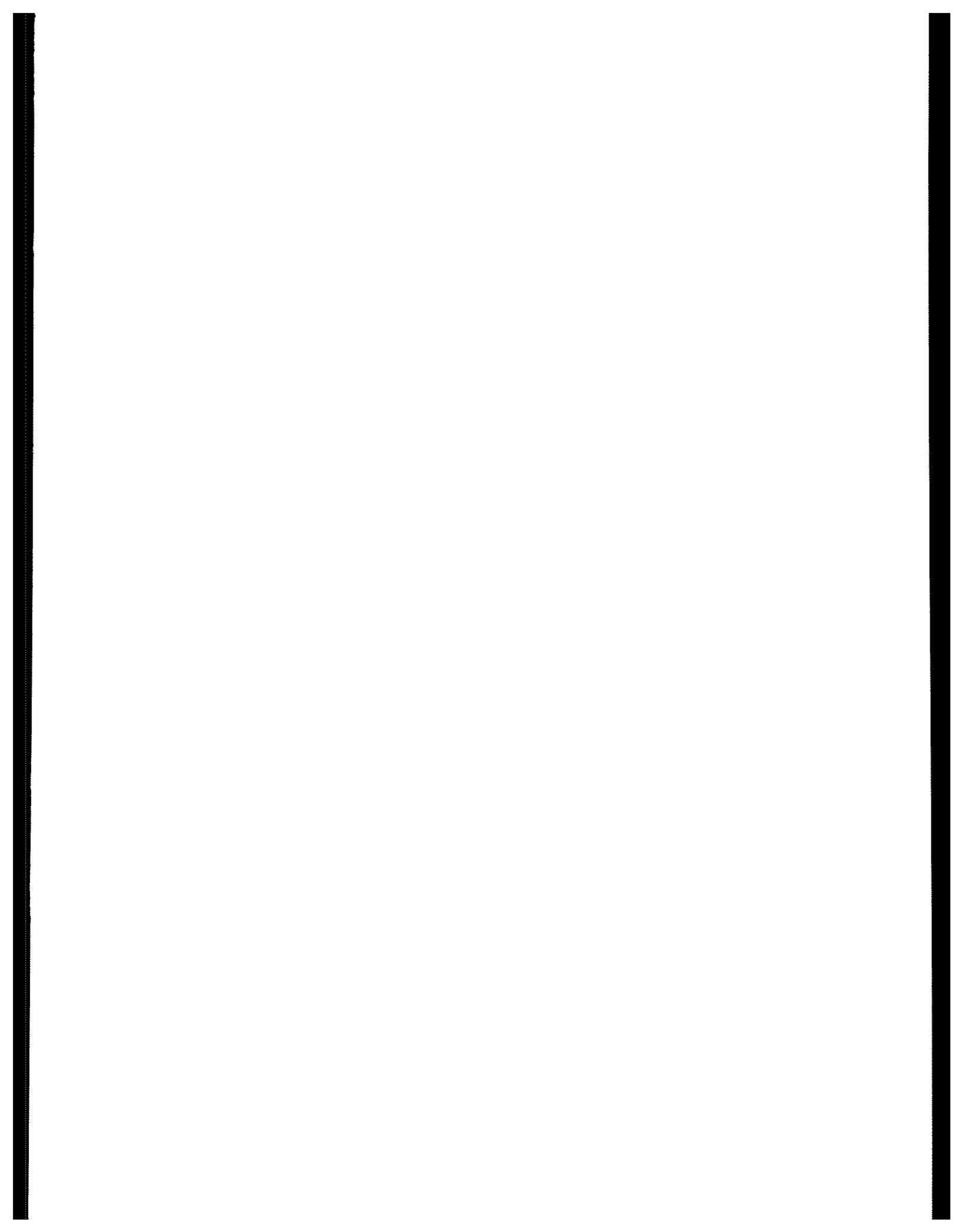
En general los síntomas fueron poco evidentes y en algunas explotaciones no hubo manifestaciones clínicas, si no que lo observado fueron aves muertas que al practicárseles la Necropsia evidenciaban la presencia de tumores.

En algunas explotaciones se observaron los siguientes síntomas: cojera, depresión acompañada de separación y aislamiento del ave, las aves se echaban bajo los nidos o bajo los bebederos antes de morir, y en algunos casos se observo un retraso en el desarrollo corporal. La enfermedad se hizo evidente en aves de más de 16 semanas de edad, sin embargo la cojera se reporto en algunos lotes a edades más tempranas.

El comportamiento de la enfermedad fue variable, con mortalidades que oscilaron de un 10 a un 50 %, con bajas de postura de hasta un 15% y disminución en incubabilidad de hasta un 10%.

7.1.2 DESCRIPCION DE LESIONES

Las lesiones de esta enfermedad se presentan como infiltraciones difusas o nodulares de órganos internos tales como. Hígado, bazo, ovario, mesenterio, páncreas, riñón, etc. Las tumoraciones encontradas fueron de tamaño variable generalmente entre 0.5 a 5 cms. de diámetro.



- **BAZO**

- ◆ Hiperplasia de pulpa blanca.
- ◆ Engrosamiento de la cápsula.

- **TRAQUEA**

- ◆ Engrosamiento del epitelio con infiltración en la submucosa de mielocitos con inclusiones acidófilas intracitoplasmicas en gran cantidad.

- **INTESTINO**

- ◆ Infiltración de células blancas en el intestino, engrosando las vellosidades,
- ◆ Infiltración de mielocitos con inclusiones intracitoplásmicas acidófilas.

- **PULMON**

- ◆ Hemorragia
- ◆ Células grandes con núcleos grandes, abundante citoplasma.
- ◆ Núcleos vesiculosos
- ◆ Infiltración de mielocitos con inclusiones de granulos acidófilos intracitoplásmicos en forma abundante.

VIII CONCLUSIONES

1. Las lesiones Histopatológicas encontradas, como infiltración de mielocitos que contienen gránulos redondos acidófilos intracitoplasmicos corresponde a Leucosis Aviar tipo mieloide.
2. Relacionando el comportamiento epidemiológico y las lesiones macroscópicas y microscópicas encontradas, se concluye que la Leucosis Aviar tipo "J" estuvo afectando a las reproductoras pesadas de Guatemala en el año 1997.
3. Como resultado de las muestras analizadas en el presente estudio y entrevistas con Profesionales relacionados podemos concluir que todas las granjas de reproductoras pesadas que funcionan en el país estuvieron afectadas en grado variable por Leucosis Aviar, durante el año 1997.
4. En la actualidad la Leucosis Aviar en Guatemala se encuentra bajo control, debido a que el año 1998 se desarrollaron aves pesadas importadas de estirpes libres de esta enfermedad, por medio de huevos fértiles y pollitos de 1 día y con Programas de Bioseguridad estricta.

IX RECOMENDACIONES

- La Histopatología es un recurso poco utilizado en el diagnóstico y diferenciación de las enfermedades víricas productoras de tumores en aves, sin embargo es uno de los métodos más precisos que permite una mejor orientación y diferenciación por lo que se recomienda su utilización.
- Para evitar en el futuro problemas con estas enfermedades es necesario que el pie de cría que se importe para la reproducción venga de granjas certificadas como libres de Leucosis Aviar.
- Se recomienda a los centros de reproducción mantener un buen programa de bioseguridad, buen manejo y un monitoreo de las aves reproductoras de esta enfermedad para evitar reinfección

X. RESUMEN

Se recolectaron 15 muestras para estudio Histopatológico: de hígado (4), pulmones (2), Bazo (2), Intestino (2), traquea (2), Riñón (3), procedentes de 2 empresas de reproductoras pesadas, ubicadas en el departamento de Guatemala, en los cuales se presentaron como síntomas: Cojera, depresión, aislamiento, retraso en el desarrollo corporal y mortalidades que oscilaron entre el 10 y 50% en los diferentes lotes. Las muestras fueron colectadas para confirmar la presencia de Leucosis Aviar del tipo mieloides cepa J en aves reproductoras pesadas en el país y para recomendar las medidas de manejo y bioseguridad que ayudan a minimizar las pérdidas en dichas granjas.

Las muestras fueron colectadas en frascos con formaldehído tamponado al 10%.

Las muestras fueron procesadas en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, con asesoría directa de dos profesionales especialistas. Se utilizó el método convencional de Histopatología con cortes teñidos con hematoxilina Eosina y análisis microscópico.

Los resultados obtenidos en las muestras recolectadas se resumen así:

Infiltración de mielocitos con inclusiones intracitoplásmicos acidófilos en gran cantidad, infiltración de células de la línea linfática y degeneración hidrópica de Hígado, infiltración de mielocitos con inclusiones acidofilas intracitoplasmicas en espacio insterticiales del riñón, sub mucosa traquea, intestino y pulmón.

XI. BIBLIOGRAFIA

1. BAINS, BS. 1979. Manual of poultry disease: Limphuid leucosis Estados Unidos, Roche. p. 149-150.
2. BIESTER, H.E.; SXJWARTE, L.H. 1954. Enfermedades de las aves El complejo de leucosis de las aves. México, Hispanoamericana. 400 p.
3. BOLETIN DE LA MESA REDONDA DE VETERINARIOS EN REPRODUCTORES PRIMARIOS. 1998. Nuevo virus de leucosis Aviar: Subgrupo J. In Avicultura Profesional (Chile). 16(2): 18-22.
4. DALES, P. I. 1998. La amenaza de la leucosis. Informador Avícola (Ill.). p.35-37.
5. DI FIEORE, M. 1962. Diagnóstico hispatológico. Buenos Aires, Ateneo. p. 612.
6. GABE, M. 1978. Techniques histologiques. 120 ed. Laborat Evolution Facultedes Sciencis. Patries. Boulevard. p. 1050
7. HITCHER, S. 1975, Isolation and identification of avian pathogens. Texas, Am University. p. 142-154.
8. HOOPS, H. 1958. Patologia. Trad. por Rafael Blengio. 2 ed. Interamericana. p. 400.
9. JONH, S. 1998. Nuevos problemas de leucosis aviar y enfermedad de Marek. México, Tecnica Científica. p. 37-40.
10. KOLINER AND BOEWER. s.f. Métodos de laboratorio químico. Estados Unidos, The University Society. p. 26.
11. LLEONART, F. et al. 1991. Higiene patología aviares. Baratona, Esp., s.n. p. 128-132
12. LUCIO, B. 1998. Generalidades sobre interacciones de algunos agentes inmunodepresores. Tecnología Avipecuaria. (Mexico,) p.127.



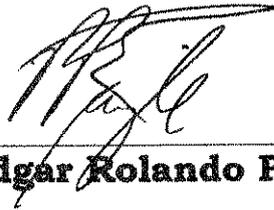
13. MALTERO, L. 1965. Inwood, método de laboratorio. Trad. por Roberto Folch Fabre. México, Interamericana. p. 617.
14. MELLORS, R. 1959. Analytical cytology. 2 ed., New York, McGrawhill, p. 510.
15. PAYNE, L.N. Inquietudes sobre la aparición del mismo de la leucosis aviar del subgrupo J y de la leucosis mieloide. Industria Avícola (Ill.), p. 32-33.
16. PEARCE, A.G. 1960. Histochemistry theoretical and applied. 3 ed. USA, Little Brown and Compony boston, v. 1. p. 525.
17. PORTEMOUTH, J. 1983. técnicas de poultry world avicultura practica. México, Continental. p.186-189.
18. RODAS, R. s.f. Situación actual de la leucosis aviar. s. l. s. n. 5 p.
19. RIOS, C. 1998. Técnicas de Laboratorio para el diagnostico de Leucosis. Tecnología Avipecuaria. México. p. 128.
20. SANTIAGO, L. 1964. Enfermedad de las aves. s.l. s.n. p. 231- 234.
21. SHANE, S. M. 1999. Estrategias frente a asistir y leucosis. In School of Veterinary Medicine Lousiana. Revista Avicultura Profesional. (Chile) 17 (2): 34-35.
22. VILLEGAS, P. 1998. Nuevas formas de leucosis aviar. Jornada Avícola Nacional Francisco Guitierrez Roig. (Guatemala). p. 56-57.





(f) **Br. RAMIRO BAILEY B.**

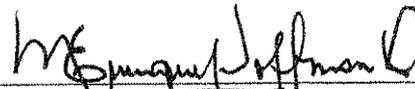
ASESORES:



Dr. Edgar Rolando Paiz C.

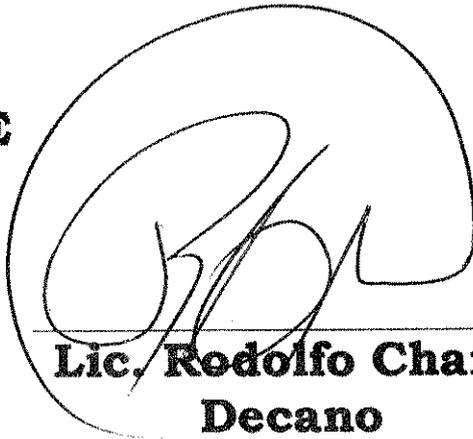


Dra. Beatriz Santizo



Dr. Manuel E. Hoffman Q.

IMPRIMASE



**Lic. Rodolfo Chang
Decano**

