COMPLEJO LEUCOSICO AVIAR: Revisión de conceptos (*)

Alejandro A. Schudel (1)

R E S U M E N

El Complejo Leucósico Aviar comprende por lo menos dos enfermedades con características etiológicas y patológicas propias. En los últimos años se han realizado importantes avances en la investigación de las enfermedades del Complejo Leucósico Aviar. Esta publicación pretende reunir los datos antiguos, trabajos actuales y nuevos conceptos, como así también señalar problemas importantes a criterio del autor, aún no solucionados.

AVIAN LEUCOSIS COMPLEX: REVIEW OF CONCEPTS

S U M M A R Y

The avian Lecousis Complex is by definition a group of et least two well defined aetiological and pathological entities.

In the last few years there has been an important increase of research with remarkable findings in this area of work, and this paper sumarize the old and current developments, new advances an unsolved problems in the view of the author.

(*) Trabajo realizado en el Regional Poultry Research Lab. East Lansing Michigan, U. S. A., con una Beca Externa del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina.

(1) Jefe de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

ANTECEDENTES

El alto grado de desarrollo y perfeccionamiento avícola logrado en los últimos años, no sólo en nuestro país sino en todas las áreas desarrolladas del mundo con alta tasa de consumo proteico, ha llevado a que el manejo avícola se realice en forma industrial.

Las fallas de manejo en una explotación de este tipo producen pérdidas de gran importancia, de las que probablemente, aquellas debidas a problemas sanitarios de los planteles sean mucho más serias, ocasionando a menudo, trastornos irreparables. En ese sentido las enfermedades del Complejo Leucósico Aviar ocupan un lugar de prioridad entre todas las entidades patológicas que afectan la industria avícola.

Enfermedad de Marek (una de las enfermedades del Complejo Leucósico Aviar) puede causar hasta el 80 % de mortalidad en parrilleros en brotes agudos, las pérdidas se manifiestan entonces en mortalidad. Leucosis Linfoidea con un cuadro epidemiológico diferente causa pérdidas por baja conversión, baja producción y una tasa de mortalidad moderada, pero constante, que en definitiva causa tanto o más pérdidas que la primera de las nombradas.

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica estima en más de 200.000.000 de dólares anuales, las pérdidas, por mortalidad y decomiso, en casos de Enfermedad de Marek, y en 100.000.000 de dólares anuales las causadas por Leucosis Linfoidea, sin considerar en esta última las pérdidas por fallas en la conversión, que son incalculables y posiblemente lleven la cuenta a valores superiores a los de Enfermedad de Marek. (Datos estimados en el año 1969.)

Datos similares a los anteriores han sido publicados por el Ministerio de Agricultura de Gran Bretaña y es posible que las pérdidas adquieran tamaña magnitud en todos los países del mundo, en los que como en el nuestro se practica la cría de pollos en forma intensiva.

La literatura en el tema es abundante, con muy buenas revisiones (Furth 1946, Phisiol. Rev. 26-47-1946 - G. Panima 1947, Vet. Ital. 8-33 - P. Biggs 1963, Poultry Rev.) pero carente de publicaciones en español.

En una rápida revisión del tema se tratará de actualizar los detalles más importantes de las Enfermedades del Complejo Leucósico Aviar, en sus aspectos etiológicos, características anatomopatológicas, epidemiología y posibilidades de control.

HISTORIA

La existencia de las enfermedades del Complejo se remonta a la antigüedad, pero las primeras evidencias concretas de su presencia en las poblaciones avícolas se tiene merced a una descripción incompleta de Roloff en 1868 (79) de un caso de linfosarcoma en pollo. En 1896 Caparini (25) describe una entidad leucémica en pollos.

Ellerman y Bang en 1908 (38) introducen el término leucosis, en la descripción de una entidad leucémica en pollos, transmisible por filtrados libres de células agregando datos epidemiológicos de interés.

Peyton Rous en 1911, en el Rokefeller Institute, realiza los trabajos pioneros sobre *virus oncogénicos* con un tumor transmisible (fibrosarcoma) aislado de una gallina Plymouth Rock transplantable sólo a su descendencia.

J. Marek describe en 1907 (62) una entidad linfoproliferativa de los nervios periféricos, denominándola *polineuritis*.

Pappenheimer y col. 1929, (72) subraya haber encontrado una incidencia del 10 % de tumores viscerales (muy frecuentes en ovario) asociados a lesiones linfoproliferativas neura-

les, denominando a este cuadro patológico *neurolinfomatosis gallinarum*.

En 1949, Burmester y col. establecen la transmisión vertical de Leucosis Linfoidea.

ETIOLOGIA

Por muchos años los conocimientos sobre los agentes etiológicos de las enfermedades del Complejo Leucósico Aviar, fueron confusos y basados principalmente en los conocimientos adquiridos con otros virus animales.

Elford y Andrewes en 1936 (40) en Sarcoma de Rous, y Burmester y col. en 1947 (17) en Leucosis Linfoidea, demuestran fehacientemente la presencia de un agente viral por medio de centrifugación diferencial.

Las primeras evidencias sobre la naturaleza física de la partícula viral de Sarcoma de Rous corresponde a Claude en 1947 (28) por medio del microscopio electrónico.

La fácil obtención de material de alto título de plasma de aves infectadas con la cepa BAI-A del virus de Mieloblastosis Aviar facilitó enormemente la purificación y caracterización química del virus, realizada por Bornard y Bear en 1959 (15) y Allison y Burke en 1962 (3), caracterizando al agente viral como un virus de RNA.

Las evidencias acumuladas en los últimos años sobre transmisibilidad, patología, epiziotología y características citopatológicas, hicieron dudar a muchos investigadores sobre una etiología simple, para todas las enfermedades del Complejo. Es así que Biggs postula una probable doble etiología en 1966 (13) basado en caracteristicas patológicas y epidemiológicas, confirmando en 1967 Churchill y Biggs (32) y Salomón, Witter, Nazerian y Burmester 1968 (93), una etiología diferente para Enfermedad de Marek, basándose en una estrecha correlación entre presencia de virus Herpes con efecto citopatológico en cultivo de tejidos y presencia de la enfermedad en pollos luego de inoculados con material celular de cultivos de tejidos. Evidentemente, el hecho de que la infección o transmisión de la enfermedad en estos experimentos se haya realizado con material celular, le dio carácter de circunstancial a estos hallazgos.

Burmester en 1969 (23), agrega datos adicionales que fortalecen la idea de una segunda etiología viral en las enfermedades del Complejo.

Nazerian y Witter publican recientemente la transmisión de la enfermedad con filtrados libres de elementos celulares confirmando en forma definitiva la etiología de la enfermedad de Marek.

Lee y col. en 1969 (58), presenta datos adicionales sobre la caracterización química del agente, encontrando un virus de DNA, que por sus características morfológicas, Nazerian, 1968 (66), corresponde a un virus Herpes.

Por lo tanto tenemos dos entidades patológicas muy similares con agentes etiológicos diferentes como integrantes del Complejo Leucósico Aviar.

En todas las enfermedades hay un gran número de cepas aisladas y caracterizadas, que se describirán con más detalle al referirnos a los virus en particular.

Para una mejor comprensión del tema lo dividiremos en cada una de las tres entidades y las trataremos por separado.

COMPLEJO LEUCOSICO AVIAR

Clasificación sobre bases etiológicas y patológicas

I — GRUPO LEUCOSIS SARCOMA.
Leucovirus - RNA (Tumores virales aviares).
Leucosis linfoidea (Leucosis visceral, Linfocitoma, etc.).
Eritroblastosis (Eritroleucemia).
Mieloblastosis (Leucemia mieloide, leucemia, etc.).
Mielocitomatosis.
Fibrosarcoma, Endotelioma, Hemangioma, Nefroblastoma.
Osteopetrosis

II — ENFERMEDAD DE MAREK.
Herpesvirus - DNA (Neurolinfomatosis).
Forma clásica y forma aguda (ambas linfoideas).
Linfomatosis neural (Parálisis de los pollos, etc.).
Linfomatosis ocular (Ojo de pescado, Ojo gris, etc.).
Linfomatosis visceral (Linfomatosis, etc.).

III — OTRAS SIN CLASIFICAR.
Reticuloendoteliosis (Virus T.R.E., etc.).

Este tipo de clasificación elimina definitivamente la confusión existente entre ambas enfermedades.

I — GRUPO LEUCOSIS/SARCOMA
Tumores Virales Aviares - Virus RNA Leucovirus.

1. Propiedades físicas

Las partículas virales infecciosas tienen un diámetro aproximado de 80 - 100 mu para virus de Sarcoma de Rous (RSV), Elford y Andrews 1936 (40) y de 144 mu para el virus de Mieloblastosis Aviar (AMV), Sharp y Beard 1954 (89), diferencias debidas a las técnicas empleadas en la medición, y no a las dimensiones reales de las partículas virales. Estos datos fueron posteriormente corroborados por microscopía electrónica.

El coeficiente de sedimentación es de 500 - 660 S (Svedelberg) para RSV Kahler 1954 (54), y de 500 - 600 S para AMV Sharp y Beard 1954 (89). El peso seco aproximado por partícula es de 7.5×10^{-10} ug (microgramos).

Debido a al alto contenido en lípidos de su membrana externa (envelop) manifiestan una gran sensibilidad al tratamiento con éter (sensibilidad que se manifiesta en todas sus envolturas excepto en el nucleocapsid), dando constancia de un alto contenido lipídico en todas sus membranas, y ausencia de lípidos en el nucleocapsid. Por microscopía electrónica se determinó el proceso de salida del virus (budding), proceso que le brinda la envoltura externa al virus a partir de la membrana celular y de allí el alto contenido lipídico.

Son virus muy termolábiles, la vida media es de 100 - 120' a 37°C para Virus Asociado de Rous (RAV) subtipo I, Hanafusa 1964 (47). Distintas condiciones experimentales dan resultados diferentes en cuanto a termolabilidad se refiere, pero evidentemente las condiciones experimentales fueron muy distintas, al menos en tres de los factores principales:

— Diferentes cepas de virus pueden demostrar distinta sensibilidad.
— Origen (tejido) del virus.
— Composición del medio.

La temperatura ideal para el mantenimiento indefinido del virus es de — 60°C o menores, sin pérdida de infectividad por períodos superiores a los 5 años.

La liofilización es un proceso aconsejable, aunque debe realizarse con mucho cuidado, pues el virus es muy sensible a los procesos oxidativos.

Cómo suceden estos fenómenos de pérdida de infectividad por temperatura, es todavía una incógnita, aunque parecería que los procesos oxidativos llevan a la inactivación del virus, ya que los agentes reductores disminuyen extraordinariamente la inactivación, Engelberth y Holm 1938 (39).

El proceso de inactivación se comporta como una reacción enzimática de primer orden aunque en determinadas circunstancias, se diferencia de una reacción de este tipo, como ocurre por ejemplo con el tratamiento del material viral por sonicación previo al ensayo, donde se observa una clara desviación de la reacción de primer orden, concluyéndose entonces, que esta pérdida de infectividad se debe en su mayor parte a la formación de grumos (Clusters) virales.

Son muy estables a pH 5 - 9, pero inestables a pH más altos o más bajos.

Altamente resistentes a la inactivación por luz ultravioleta, unas 10 veces más resistente que el virus de Newcastle (NDV), pese a poseer parecidas características morfológicas, estructurales y sensitividad a radiación X, Rubin y Temin 1959 (80).

2. Composición Química

El alto grado de pureza de los materiales empleados para el análisis químico del virus, requiere de técnicas delicadas para concentración de virus.

La composición química del virus de Mieloblastosis Aviar (AMV):

35 % lípidos
62.8 % proteínas
2.2 % RNA

La molécula de RNA es de cadena simple e integrada por dos componentes principales. Un componente sedimenta al doble del coeficiente de sedimentación del virus de Mosaico del Tabaco en 0.11 M ClNa, y es considerada como la molécula de RNA completa, el segundo componente está compuesto por subunidades del RNA principal rotas durante la purificación, Robinson y Duesberg, 1967 (78).

El análisis de bases del RNA viral difiere en la mayoría de los trabajos en la materia, probablemente debido a diferentes condiciones experimentales.

El análisis de las proteínas virales revela la existencia de dos componentes:

1 — identificable con la fracción de actividad fijadora del complemento.
2 — de naturaleza enzimática, sin significado funcional.

3. Ultraestructura

Por sombreado electrónico (Shadow-casting) se obtuvieron las primeras medidas virales en el microscopio electrónico de 80 a 100 mu para RSV.

En preparaciones ultrafinas es posible observar la morfología viral, con una envoltura externa (envelop) de 80 - 90 mu de diámetro, con prolongaciones exteriores en forma de tornillos (Knows). La envoltura externa cubre una segunda membrana llamada membrana interna que envuelve completamente el corazón (core) de un diámetro de 30 - 40 mu constituido por el RNA viral.

La partícula viral completa corresponde al tipo C, descripta por Bernhard 1958 (8), Bernhard 1956 (9), Hageneau 1959 (45).

En preparaciones donde se emplea coloración negativa (negative staining) se observan las protrusiones periféricas (Knows) ya descriptas, muy semejantes a las existentes en los mixovirus, pero en este caso no se ha demostrado ninguna propiedad hemoaglutinante.

La existencia de formas con cola en las preparaciones negativas, ha sido motivo de muchas discusiones, artificios para algunos, otros, sin embargo, consideran a éstas como formas de tipo L (L — forms), E. Alexander-Jackson 1969 (2).

4. Purificación

Se realiza a partir de tumor de pollos con la técnica de Moloney 1960

(65), en que la concentración final se realiza expresando el resultado en gr de tumor original. Es eficiente en cuanto a la concentración del material viral pero no elimina la totalidad de las impurezas celulares.

Los cultivos celulares son muy eficientes en la producción de virus en alto título, aunque no eliminan la contaminación celular. Aun así pueden obtenerse títulos de 1.0×10^9/cc para alguno de los leucovirus.

La purificación del virus de Mieloblastosis Aviar (AMV) a partir de plasma de aves infectadas, es el mejor procedimiento cuando se incursiona en experiencias de naturaleza química, dado que se necesita virus de gran pureza, libre de contaminantes celulares, por ello es el material de elección, lográndose además títulos de hasta 10×10^{12}/cc, Bonard y Beard 1959 (15).

5. Propiedades controladas por el hospedador

El mecanismo por el cual la partícula viral emerge de la célula, es de gran importancia, ya que le confiere la cubierta externa. Por lo tanto, antígenos celulares integrarán la partícula viral, junto a antígenos específicos del virus.

Los anticuerpos contra el tejido normal de pollo y Antígeno de Forsman, inactivan a la partícula viral en presencia del complemento, prueba evidente de la presencia de antígenos celulares en la partícula viral.

El virus de Mieloblastosis Aviar (AMV) contiene adenosin-trifosfatasa (TPA) que actúa sobre el adenosintrifosfato (ATP) o inosintrifosfato (ITP) como sustratos, Green y Beard 1955 (44). Pequeñas cantidades de fosforilasa-fosfonucleótido permanecen adheridas a la membrana externa viral. Ambas enzimas se adquieren durante el proceso de salida del virus (budding) de la célula hospedadora.

6. Antigenicidad

La cubierta externa de la partícula viral contiene los antígenos específicos de tipo, que participan en las reacciones de neutralización y anticuerpo fluorescente con suero preparado a partir de pollos inoculados con partículas virales infecciosas. Estas reacciones de neutralización se utilizan para identificar cepas antigénicamente diferentes, Distéfano y Dougherty, 1961 (36), Ishizaki y Vogt 1966 (53). Hay reacciones de neutralización cruzada entre varias cepas virales. La especificidad de los antígenos de la cubierta externa será discutida luego, en relación con las características de subgrupo de los virus del grupo Leucosis/Sarcoma.

Los anticuerpos fijadores del complemento reaccionan con todos los virus del grupo Leucosis/Sarcoma. Se emplea suero producido en hamster (Syrian) el que desarrolla un tumor como resultado de la inoculación de la cepa Schmidt-Ruppin, Huebner, 1963 (52). El antígeno responsable de esta reacción se encuentra también en cultivo de tejido infectado con cualquiera de los virus pertenecientes a este grupo. Por microscopía de fluorescencia este antígeno ha sido identificado en la partícula viral, Kelloff y Volgt, 1966 (55). Los anticuerpos específicos de grupo (fijadores del complemento) no neutralizan la partícula viral. Esto indica que el antígeno específico de grupo está localizado dentro del capsid y no en la envoltura externa, reafirmado por el hecho de quedar en libertad luego del tratamiento de la partícula viral con sodio-dodecil-sulfato.

7. Ciclo de Infección

Cuando un cultivo de fibroblastos de embrión de pollo, alargados y chatos, se infectan con virus de Sarcoma de Rous (RSV), cambian morfológicamente, tomando forma esférica y refráctil, Manaker y Groupe 1956. Esta propiedad de transformar la morfología celular es la base del test de identificación viral in-vitro (focus assay).

El número de focos es directamente proporcional a la concentración de virus en el inoculum. Por lo tanto una

sola partícula de RSV es capaz de infectar una célula y transformarla.

El ciclo de crecimiento de estos virus ha sido estudiado in vivo e in vitro. Los sistemas in vivo guardan sólo su interés histórico, y no serán considerados en este trabajo.

Al infectar un cultivo de tejido con virus de Sarcoma de Rous el período de eclipse comienza dentro de la primera hora.

A las catorce horas, la síntesis de nuevo virus es evidente, creciendo en forma exponencial hasta los 4 días luego de la inoculación. Este aumento no representa una mayor cantidad de virus producido sino una mayor cantidad de células infectadas que entran en la fase de producción. Entre el tercero y cuarto día se establece un equilibrio entre el virus producido y el virus inactivado por temperatura.

El tiempo que tarda en ser eliminado el virus por la célula puede ser fácilmente calculado en la parte ascendente de la curva de crecimiento, tomando como base "la razón" entre virus intracelular y virus extracelular. Este tiempo de eliminación viral (reseasing time) es definido como el tiempo transcurrido desde que una partícula viral es completada en el citoplasma hasta que aparece en el medio extracelular. Para estos virus es muy corto, y lo prueba el hecho de que hay una mayor cantidad de virus extracelular que virus intracelular.

Estudiando con el microscopio electrónico celulas infectadas puede observarse que el virus es eliminado por gemación (budding) de la partícula viral en la membrana celular, Heine 1962 (50), Haguenau 1962 (46). El "budd" comienza a constreñirse en su base hasta que se desprende totalmente de la membrana celular.

Es frecuente observar agregados de virus en la membrana celular donde permanecen por largo tiempo. Luego de 24 horas de infección el antígeno específico de tipo se observa en la membrana celular, Vogt y Luykx 1963 (99). La cantidad de antígeno viral que es pequeña al principio, aumenta gradualmente durante el ciclo de infección.

Los virus de Leucemia aviar, tales como mieloblastosis, eritroblastosis, Leucosis Linfoidea, etc., no inducen cambios morfológicos al infectar cultivo de fibroblastos de embrión de pollo, excepción de MC 29 Langlois. Bear 1969 (57), pero son continuamente producidos, por las células infectadas.

8. Mecanismo de Síntesis

Los virus tumorales aviares no contienen DNA, sólo RNA, Crawford y Crawford 1961 (34), Robinson 1965 (77), Duesberg 1969 (37), sin embargo para su replicación necesita de la síntesis de DNA, Bader 1964 (4), Temin 1964 (96), Bader 1966 (5), Knudson 1967, Melnik 1969. Los inhibidores específicos de DNA previenen la formación de partículas virales y la transformación celular si actúan en las primeras 8 horas de infección. Luego de 8 horas la actividad de los inhibidores de DNA es todavía discutida, Rubin 1969 (84), Melnik 1969. De acuerdo a Bader 1966 (6), es necesaria la producción de proteínas celulares en las 8 primeras horas siguientes a la infección. La producción de un template de DNA desde el cual el RNA viral se replicaría, podría explicar la necesidad de DNA en los primeros momentos de la síntesis viral. Sin embargo hasta que la forma replicativa del genome de estos virus sea hallada, la existencia de dicha forma replicativa del DNA es especulativa. Una segunda hipótesis podría ser la existencia de una proteína cuya presencia es necesaria para la iniciación de la síntesis viral y la transformación celular. El gene que codifica para esa proteína estaría reprimido en la célula normal pero luego de la infección celular por el virus, el genome celular requeriría un ciclo simple antes que se logre la desrepresión y la transcripción del genome.

9. Bases para la Clasificación en Subgrupos

Estudios recientes sobre las propiedades de la membrana externa de la

partícula viral, han revelado que por lo menos existen cuatro diferentes subgrupos, basándose en la *antigenicidad* expresada por los distintos tipos virales, *interferencia* entre los miembros del mismo subgrupo y *susceptibilidad de hospedador* en diferentes poblaciones genéticas. Ver tabla Nº 1.

Los anticuerpos neutralizantes producidos en pollos infectados son específicamente dirigidos contra el antígeno específico de tipo de la cubierta externa viral. Usando técnicas de clonado, es posible aislar cepas puras de virus, que inoculados en pollos libres de infección, producirán antisueros específicos contra su envoltura externa.

Por reacciones de neutralización y anticuerpo fluorescente podemos clasificar la mayoría de los virus en cuatro subgrupos con reacciones de neutralización específica entre los miembros del mismo subgrupo, pero ninguna o al menos mínima reacción de neutralización entre los miembros de los distintos subgrupos. Ver tabla número 1.

Las células que han sido infectadas con un virus de Leucosis Linfoidea son resistentes a la sobreinfección con virus de Sarcoma de Rous (RSV). Esta es la base del test de RIF (Resistant Inducing Factor) para los virus de Leucosis. Rubin, 1960 (82). Ver cuadro Nº 2.

El grado de efectividad de la interferencia depende de la combinación de los virus infectante o sobreinfectante (RIF y RSV, respectivamente). Los cuatro subgrupos están determinados por patrones de interferencia que se manifiesta exclusivamente entre miembros del mismo subgrupo.

Este fenómeno de interferencia es también una propiedad de la envoltura externa.

El virus infectante ocuparía los receptores celulares específicos, los que al estar ocupados por el virus RIF (Leucosis Linfoidea), no permitirán la entrada del virus sobreinfectante (RSV), Steck y Rubin, 1966 (94).

La tercera propiedad de la envoltura externa define cuatro subgrupos virales A-B-C-D de acuerdo a la susceptibilidad de hospedador en fibroblastos de embrión de pollo genotípica y fenotípicamente diferentes. Esta es sin duda la más clara evidencia de la existencia de cuatro subgrupos virales con propiedades infectantes. diferentes. Ver cuadro Nº 3.

Los fenotipos celulares identificados hasta ahora son C/O, C/A, C/B, C/AB, donde C significa pollo (chiken), la barra resistente a y la letra mayúscula el subgrupo viral excluido. Vogt e Ishizaki, 1965 (101).

Los fenotipos son controlados por dos locus autosómicos independientes llamados Tva y Tvb (Tumor virus A y tumor virus B, respectivamente). Ver cuadro Nº 4.

Los alelos que controlan susceptibilidad a^s b^s son dominantes sobre los alelos que controlan resistencia a^r b^r (hasta hoy no hay datos sobre susceptibilidad o resistencia para los subgrupos C y D).

Aparentemente los alelos para susceptibilidad controlan los sitios específicos de penetración viral. Por lo tanto la resistencia genética, actuaría al mismo nivel que interferencia (penetración o decapsidación).

El hecho de que las células resistentes puedan ser infectadas de alguna forma con el genome del virus excluido (mediante mezclas fenotípicas) y producir progenie viral infecciosa, establece definitivamente que la cubierta externa viral controla las propiedades del subgrupo y no la célula hospedadora. La mayoría de los virus de leucosis aislados en condiciones de campo, corresponden al subgrupo A, y algunos al subgrupo B, se sospecha, además, la presencia del subgrupo C aunque nunca ha sido aislado.

TABLA Nº 1

VIRUS DEL GRUPO LEUCOSIS / SARCOMA

Neoplasia Inducida	*Subgrupo Viral*			
	A	B	C	D
Sarcomas (Pseudotipos)	BH-RSV-RPL 12 BH-RSV-RAV 1 BS-RSV-HPRS-F 42	BH-RSV-RAV 2 BH-RSV-RIF 2	BH-RSV-RAV 49 BH-RSV-RAV 7 BH-RSV-RAV 4	BH-RSV-RAV 50
Espontáneos	PRC 2-A PRC 4 29 RSV	HA-RSV PRC2 SR-RSV-2	PR-RSV B 77 MH2	SR-RSV CZ-RSV
Leucosis Linfoidea	RPL 12 HPRS-F 42 RAV 1	RAV 2 RIF 2 RAV 6	RAV 49 RAV 7 RAV 4	RAV 50
Eritroblastosis		ES 4	AEV-R	
Mieloblastosis	AMV-A	AMV-B		
Osteopetrosis	MAV-1	ARC MAV-2		
	RAV 3 RAV 5 FAV 1 FAV 2 SR-RSV-1 FSV-FAV-1 FSV-FAV-2			

CUADRO Nº 2

INTERFERENCIA ENTRE LOS VIRUS TUMORALES AVIARES

Virus Interferente	Subgrupo de RSV usado para enfrentamiento (Revelador)	
	A	B
Subgrupo A	Interferencia	No Interferencia
Subgrupo B	No Interferencia	Interferencia

CUADRO Nº 3

RESISTENCIA CELULAR CONTRA LOS VIRUS TUMORALES AVIARES

Fenotipo celular	Subgrupo de Virus Tumorales Aviares	
	A	B
C/O	Sensible	Sensible
C/A	Resistente	Sensible
C/B	Sensible	Resistente
C/AB	Resistente	Resistente

CUADRO Nº 4

Nomenclatura Genotípica y Fenotípica para la resistencia celular a los virus tumorales aviares controlados por los locus Tva y Tvb

Genotipo	Fenotipo (celular)	Sensible (S) o resistente (R) a los distintos subgrupos de los virus tumorales aviares de los subgrupos A y B.	
		A	B
$a^s a^s$ $b^s b^s$	C/O	S	S
$a^s a^r$ $b^s b^s$	C/O	S	S
$a^r a^r$ $b^s b^s$	C/A	R	S
$a^s a^s$ $b^s b^r$	C/O	S	S
$a^s a^r$ $b^s b^r$	C/O	S	S
$a^r a^r$ $b^s b^r$	C/A	R	S
$a^s a^s$ $b^r b^r$	C/B	S	R
$a^s a^r$ $b^r b^r$	C/B	S	R
$a^r a^r$ $b^r b^r$	C/AB	R	R

10. Virus del grupo Leucosis Sarcoma Defectivos

La cepa *Bryan High titer* del virus de Sarcoma de Rous (BH-RSV) produce áreas focales de células transformadas al infectar cultivos de fibroblastos de embriones de pollo en cultivos de tejido.

Estas células transformadas toman una típica apariencia redondeada y al no existir inhibición por contacto crecen sin restricción hasta formar varias capas celulares que caracterizan al foco (foci).

Cuando esta preparación viral se diluye por encima de su punto final (end point) en lo que a formación de focos se refiere, podemos aislar otra partícula viral denominada Virus Asociado de Rous (Rous Associated Virus). RAV que no produce efecto citopatológico y está siempre pre-

sente en las preparaciones de BH-RSV. Luego de la propagación del Virus Asociado de Rous por varios pasajes en fibroblastos de embrión de pollo, induce resistencia al posterior enfrentamiento con Virus de Sarcoma de Rous.

RAV y RSV no se diferencian ni en termolabilidad, sitio de maduración celular, crecimiento, especificidad inmunológica (el antígeno específico de grupo gs. es común a ambos), características fenotípicas de la envoltura externa y susceptibilidad celular. La única diferencia es la incapacidad de formar focos en cultivo de tejidos y sarcomas en pollos por parte de RAV. De la inoculación en pollos resulta la aparición de leucosis linfoidea, por lo que son incluidos en el grupo de virus Leucosis/Sarcoma.

Si se aislan por clonado, focos de células transformadas usando baja multiplicidad de infección (inoculum que producirá poco efecto citopatológico en el cultivo) al propagarse en medio adecuado, estas células transformadas se propagan en forma indefinida manteniendo sus características morfológicas, pero fallan en la producción de virus infecciosos, ya sea *RSV* o *RAV*, presentes en el inoculum original.

Sin embargo la adición de RAV a estas células transformadas y clonadas, inicia la síntesis de RSV y RAV en grandes cantidades, con las características del virus RAV infectante.

Estas evidencias demuestran en forma más que suficiente la defectividad de RSV, ya que necesita la ayuda de un virus ayudante (Helper) (RAV) para la síntesis de un virus infectante completo.

Cualquiera de los virus de campo aislados de casos de Leucosis Linfoidea actúa como virus ayudante de la producción viral en estas células No Productoras.

De las cepas testadas hasta ahora BH, Harris y Fujiyami han demostrado ser defectivas en tanto no lo son Schmidt-Ruppin (SR) y Prague (PR).

Las células transformadas por el RSV, llamadas NP (non producers) forman la base del test de NP que detallaremos más adelante siendo hoy conocidas como L-R (células de Rous negativas a Leucosis).

La propiedad defectiva de RSV radica en su genome que es incapaz de dirigir la síntesis de su cubierta externa (envelop) necesitando para ello la ayuda de un virus ayudante. Ver cuadro Nº 5.

Por lo tanto el virus ayudante colaborará en la síntesis de su cubierta externa al infectar la misma célula, es decir RSV usará la cubierta externa del virus (RAV) ayudante, y por lo tanto adquirirá sus características fenotípicas.

Es en esta forma como se producen las mezclas fenotípicas virales, si por ejemplo, infectamos simultáneamente un cultivo celular de células fenotípicamente determinadas como C/O con un virus del subgrupo A y otro del subgrupo B tendremos células infectadas por ambos virus cuyas cubiertas externas, serán mosaicos antigénicos de los virus infectantes (A y B), pero llevarán el genome de uno u otro. Este hecho posibilitará que ese virus infecte y multiplique en células que previamente le eran resistentes, ya que como vimos anteriormente la resistencia o susceptibilidad a la infección en lo que concierne a la partícula viral, depende de su envoltura externa. y ésta será una mezcla de ambas envolturas externas (A y B).

Este fenómeno refirma que la resistencia o susceptibilidad a la infección se manifiesta en los procesos de decapsidación o penetración y no en la multiplicación, Piraino 1967 (73).

Las células L-R (NP) resultantes de la infección de una célula susceptible a la infección, por una partícula de RSV defectiva, fueron consideradas por muchos investigadores como No Productoras absolutas, confirmando la hipótesis de defectividad del Virus de Sarcoma de Rous.

Recientes investigaciones demuestran la falla del sistema celular empleado anteriormente en la detección de virus infeccioso producido por las

células NP, llamadas correctamente L-R de acuerdo a la terminología empleada para la nomenclatura de bacteriófagos, Hanafusa 1968 (48).

Vogt 1967 (102), y Weiss 1967 (103) y 1968 (104), demuestran la síntesis de virus infeccioso detectable en fibroblastos C/A y C/O. Esta susceptibilidad de hospedador por demás inusual, los llevó a llamarlos RSV (0), característico además por su alto grado de interferencia con miembros del subgrupo B.

Hay dos tipos de RSV (0), uno producido por célula L-Rα conocido como RSV (0)α sin hospedador conocido y otro producido por las células L-Rβ, llamado RSV (0)β con baja infecciosidad en fibroblastos C/O, C/A e interferencia con miembros del subgrupo B.

La producción de estos tipos virales no está determinada solamente por el genome viral, sino por una más estrecha interacción célula-virus, tal como lo sugiere Hanafusa 1970 (49).

CUADRO Nº 5

FUCIONES CONTROLADAS POR: *Virus Ayudante*	FUNCIONES CONTROLADAS POR: *Genome de RSV* (independientes del ayudante)
Maduración Viral	Replicación del RNA viral
Especificidad antigénica de la cubierta externa	Transformación de la célula infectada
Susceptibilidad de hospedador	Morfología celular
Patrón de interferencia	Morfología del foco
	Presencia de Gs., antígeno específico de grupo.

11. Ocurrencia

La presencia del virus causal de Leucosis Linfoidea ha sido demostrado en casi todas las poblaciones de pollos controladas, ya sea por la presencia de virus o la presencia de anticuerpos neutralizantes. (El aislamiento del virus se realiza en aves adultas o en su progenie, ya que se transmite en forma vertical, vía embrión).

Es frecuente la ocurrencia de virus del subgrupo A en condiciones de campo, los virus del subgrupo B son menos frecuentes, y los del grupo C hasta ahora son sólo mantenidos y estudiados en condiciones de laboratorio.

La infección ocurre antes de llegar las aves a la madurez sexual, pero la incidencia de la enfermedad es baja en esta época, aumentando paulatinamente con el correr del tiempo.

La presencia de la enfermedad es de tipo enzoótico, aunque a veces se han reportado casos epizoóticos de osteopetrosis o hemangiomatosis.

El hospedador natural del virus es el pollo, pero por pasajes sucesivos y rápidos se posibilita su adaptación a un hospedador inusual, inclusive mamíferos. De todos los virus tumorales conocidos, el virus de Sarcoma de Rous es el poseedor del más ancho espectro de susceptibilidad. Ahlstrom 1964 (1).

12. Transmisión

La mayoría de los datos acumulados por la bibliografía acerca de la transmisión de los virus del grupo Leucosis/Sarcoma, están relacionados a Leucosis Linfoidea.

La transmisión de la enfermedad ocurre en forma horizontal o vertical, Burmester y Walter 1961 (20), 1962 (21) y Rubin, Cornelius y Fanshier 1961 (83), ave a ave la primera y madre a hija la segunda, vía huevo.

El virus se elimina por saliva y heces, Burmester 1954 (19), por lo que las aves pueden fácilmente infectarse por vía aerógena.

Sin embargo la transmisión horizontal de la enfermedad se realiza en forma ineficiente, pues el virus se inactiva fácilmente en el exterior, y entonces el contacto entre ave y ave se hace necesario para la transmisión horizontal, Burmester 1954 (19). A la infección horizontal, por contacto o por aerosoles resulta una inmediata respuesta inmunitaria con producción de anticuerpos que pueden detectarse fácilmente por test de neutralización.

La transmisión vertical es la más importante, ya que resulta en la perpetuación del virus y provee la fuente de infección por contacto a los demás. En casos de campo pueden identificarse cuatro tipos distintos de respuestas a la infección viral:

1. Virémicos sin anticuerpos, fueron infectados a temprana edad o in ovo, son inmunotolerantes. Las hembras con estas características son las principales sembradoras del virus.
2. Alto nivel de anticuerpos, no se detecta virus.
3. Aves con anticuerpos, pero que ocasionalmente siembran virus.
4. Aves sin virus y sin anticuerpos

Los machos no transmiten la enfermedad por vía congénita, pese a la demostración de partículas virales en sus órganos seminales. En contraste, la mayoría de los embriones de hembras virémicas, serán constantemente virémicos.

Los principales índices de mortalidad se registran en los lotes provenientes de aves virémicas y no, de no virémicas.

El aislamiento de virus de saliva de pollos de 1 día de edad confirma que están infectados in ovo, y permanecerán inmunotolerantes durante toda la vida, actuando como fuente de infección horizontal para los demás pollos del plantel.

De los pollos infectados congénitamente o por contacto en los primeros días de vida, sólo pocos desarrollan tumores en condiciones naturales. En el desarrollo tumoral incidirá fundamentalmente la constitución genética del hospedador.

Actualmente se considera la existencia de dos niveles de resistencia a Leucosis Linfoidea, se presume la existencia de un tercer nivel aún no demostrado.

Cuando el virus infecta el animal, las primeras manifestaciones están dadas por la susceptibilidad o resistencia celular como ya lo explicamos anteriormente, ésta correspondería a la primera barrera de defensa y está determinada genéticamente por la existencia de un alelo autosómico recesivo para los subgrupos A y B.

Infectada la célula, sucede la multiplicación viral y la subsecuente producción de anticuerpos (no hay producción de anticuerpos si no hay multiplicación viral) y pueden entonces desarrollarse o no tumores. Esta es la segunda barrera de defensa, es decir, la de desarrollar o no, tumor. Esta segunda barrera podría ser de naturaleza inmunitaria; o bien la formación de tumor puede corresponder a una determinada cantidad de virus mínima como para inducir neoplasia.

Un ejemplo muy interesante lo dan las líneas genéticas de pollos de alto grado de consanguinidad, mantenidas en el Regional Poultry Research Laboratory East Lansing, Michigan. Ver cuadro Nº 6.

CUADRO Nº 6

Línea	Fenotipo	Susceptibilidad celular a infección viral	Formación de tumor
7	C/AB	resistente a A-B	no
6	C/O	susceptible A-B-C-D	no
15 I	C/O	susceptible A-B-C-D	sí

Es por esto que la selección por resistencia a cualquiera de estos dos niveles adquiere importancia. La primera barrera interviene en forma de resistencia a la infección y reduce la incidencia de la enfermedad. Los test realizados en poblaciones comerciales demuestran la existencia de los alelos para resistencia a los subgrupos A y B.

El segundo mecanismo de defensa permanece aún indefinido, y los resultados no son conclusivos, indicando la existencia de una gran variabilidad a este nivel.

La introducción de genes que inducen resistencia en las líneas comerciales es muy atractiva sobre todo en el caso del primer nivel de defensa (donde está), controlado por un solo gen simple.

Además la introducción de un gen que ofrezca resistencia a la infección, finalmente conducirá la erradicación completa de la enfermedad.

13. Espectro tumoral

Cuando una cepa viral del Grupo Leucosis/Sarcoma se propaga en forma seriada utilizando altas dosis de virus, se obtiene una respuesta tumoral similar luego de cada pasaje (considerando la utilización de una misma fuente de aves susceptibles). Un buen ejemplo es el virus de Sarcoma de Rous que siempre induce tumores sólidos del tejido conectivo. Sin embargo las cepas que producen tumores del tejido hematopoyético a veces producen tumores sólidos. El espectro tumoral puede demostrarse fácilmente en el pleitropismo de respuestas que manifiestan los distintos virus testados.

Casi siempre al producirse un cambio en el método de transmisión se produce una variación en la respuesta tumoral.

Hay dos teorías para explicar esta variación. Una expresa que un solo virus es capaz de producir las distintas respuestas. La segunda, que cada manifestación patológica es producida por una cepa viral diferente, y por lo tanto la mayoría de las cepas que producen más de una respuesta tumoral serían mezclas de cepas virales. No existen evidencias conclusivas de ninguna de las dos hipótesis, y las dos posibilidades son factibles.

Hay pruebas experimentales suficientes con virus de Sarcoma de Rous y Mieloblastosis Aviar, de que el pollo luego de infectado será pronto virámico y varios de sus sistemas celulares (conectivo y mielopoyético) soportarán la multiplicación y transformación viral, pero otros, como el epitelial, no soportarán el crecimiento tumoral, por lo tanto hay una especificidad de tejido en lo que respecta a espectro oncogénico.

Hay datos que sugieren que el sistema genético que controla la infección y multiplicación viral, es completamente independiente de la causante transformación celular como lo discutiremos más adelante.

El mejor ejemplo de la especificidad de los virus tumorales aviares es la relación existente entre virus y células susceptibles de la Bolsa de Fabricius en la producción de Leucosis Linfoidea. Aun cuando diferentes ti-

pos celulares son infectados, la transformación neoplásica sólo ocurre en la Bolsa de Fabricius. Luego de un largo período latente, las células de la Bolsa de Fabricius migran a otros tejidos y desarrollan allí tumores visibles a simple vista. La extracción de Bolsa de Fabricius antes de la periferización celular de Bolsa de Fabricius impide la aparición de Leucosis Linfoidea; la bursectomía influencia la incidencia de Leucosis Linfoidea si se realiza hasta tres meses luego del nacimiento.

Volviendo al tema inicial, si variamos algunos factores en la inducción del tumor, la respuesta del inoculum será diferente. Burmester y Fredrickson 1961 (20).

Los factores que influencian esta variación son:

1. Origen del virus.
2. Dosis de virus administrada.
3. Ruta de inoculación.
4. Influencia del hospedador.
5. Edad.

14. Patología

Eritroblastosis

Muy rara en condiciones de campo, aparece frecuentemente en inoculaciones experimentales con cualquiera de los virus de Leucosis Linfoidea. El cuadro patológico es muy parecido a los de leucemia eritroidea en medicina humana.

La etiología viral de esta leucemia es bien conocida, y hay varias cepas que producen una respuesta de 100 % de eritroblastosis luego de inoculadas a pollos susceptibles de 1 día de edad, la enfermedad aparece a las 4 semanas. Si se inocula con una dosis menor de virus o se retarda la inoculación, el espectro patológico cambia y desciende la proporción de eritroblastosis aumentando la proporción de Leucosis Linfoidea.

Diagnóstico macroscópico: La alteración más característica se observa en hígado y bazo, aparecen agrandados y de color rojo brillante. Ascitis es un hallazgo frecuente y en médula ósea se observa una liquefección característica de color rojo.

Diagnóstico microscópico: Es en médula ósea donde se aprecian los cambios más drásticos. La arquitectura característica con focos bien delimitados y aislados de células eritroideas intrasinusoidales, está completamente alterada. Los sinusoides del hígado y bazo están repletos de células eritroideas de tipo neoplásico, resultando la conocida leucoestasis (leukostasis) que caracteriza a esta leucemia intravascular, Feldman y Olson, Biester y Swarte 1964 (42).

Mieloblastosis:

Es una de las primeras manifestaciones virales leucémicas estudiadas, Ellermann y Bang 1908 (38). La cepa más característica es la *AMV* aislada por Beard. La sangre periférica está repleta de formas mieloblásticas inmaduras en los casos agudos. Son comunes cuentas de hasta el 70 % de glóbulos blancos inmaduros, aunque pueden encontrarse formas subagudas con pocas células inmaduras circulantes. Diluciones de este virus producen nefroblastoma y osteopetrosis.

Diagnóstico macroscópico: La médula ósea aparece hiperplástica, de color marrón. Hay hepatomegalia y esplenomegalia con tumores difusos en riñón. El diagnóstico diferencial con eritroblastosis, no es fácil aunque la diferencia en la coloración de los órganos viscerales (hígado y bazo intensamente rojos en eritroblastosis), médula ósea roja en eritroblastosis y marrón en mieloblastosis y la presencia de ascitis en eritroblastosis ausente en la mayoría de los casos en mieloblastosis.

Diagnóstico histológico: Las células neoplásticas varían en su morfología pero son de un tamaño aproximado a las 10 u. Es frecuente observar prolongaciones citoplásmicas. El citoplasma es basófilo con gránulos y vacuolas, la diferencia con linfocitos grandes, es fácilmente apreciable ya que estos últimos tienen la

cromatina agrumada y halo perinuclear.

Hay células en distinto grado de maduración, pero la médula ósea es el órgano básico constituido por una sólida masa celular de mieloblastos. La cuenta de mieloblastos en sangre periférica puede llegar a 1.000.000 por cm^3. Si la inoculación de virus se realiza a las 8 semanas, la Bolsa de Fabricius, actúa como antagonista y la enfermedad no desarrolla, en oposición a Leucosis Linfoidea, Baluda 1967 (7).

Mielocitomatosis

Está estrechamente relacionada a mieloblastosis, ya que el grupo celular susceptible es de la serie granulocítica, pero a diferencia de mieloblastosis presentan una forma más madura.

La enfermedad es de etiología viral, Mladanov 1967 (64), reproducible por repetidas inoculaciones, y asociada a mieloblastosis. Es de aparición muy poco común y ocurre frecuentemente en aves maduras, como una manifestación subleucémica o aleucémica.

Diagnóstico macroscópico: Es frecuente la aparición de focos blandos, de color pálido o amarillento dispersos en los tejidos viscerales o en los huesos blandos (quilla por ejemplo).

Diagnóstico microscópico: Compactos nódulos de mielocitos con núcleo mono o bilobulado, gránulos acidófilos en citoplasma, que los hace indistinguible de un estado preosinófilo o preheterófilo.

En la médula hay una proliferación de mieloblastos en capas, no como en mieloblastosis que forman una masa compacta.

Fibrosarcoma-Endotelioma-Hemangioma-Nefroblastoma

Estos son considerados tumores sólidos. Las cuatro son de etiología viral y corresponden junto a las anteriormente nombradas al espectro de la cepa RPL-12. De estos tumores el más frecuentemente hallado en condiciones de campo es el fibrosarcoma del cual el Sarcoma de Rous es un clásico ejemplo.

El Sarcoma de Rous es usualmente un fibrosarcoma sólido y denso, cuando ocurre en tejidos duros, pero tienen características de mixofibromas cuando ocurre en tejidos blandos.

Hemangiomas y Endoteliomas son frecuentes en hígado, con lesiones hemorrágicas por rotura de capilares, dispersas en distintas partes.

Los nefroblastomas son muy similares a los nefromas embrionarios humanos, nunca producen metástasis y aparecen en aves adultas, es de frecuente observación en algunas cepas de Mieloblastosis Aviar (AMV).

Osteopetrosis

Causada por RPL 12, AMV y recientemente purificada una cepa que produce 100 % osteopetrosis (Moscovicci, University of Florida). Es una displasia diafisiaria progresiva que afecta generalmente los huesos largos. Ocurre exclusivamente en los machos. El proceso proliferativo envuelve trastornos con nueva formación de hueso, que se agrandan notablemente con muy poca médula ósea, Bell y Cambell 1964 (10). Pese a ser un proceso proliferativo no es considerado neoplásico.

Leucosis Linfoidea

Esta enfermedad fue observada en 1896 por Caparini. La cepa RPL-12 caracteriza a este cuadro patológico pese a cubrir además un gran espectro del área tumoral.

Ocurre generalmente en aves adultas, con lesiones en hígado y bazo.

Ningún órgano está exento de manifestar linfomas, sin embargo no se han observado proliferaciones neoplásicas en el sistema nervioso central.

La patogénesis de la enfermedad ha sido demostrada experimentalmente.

El virus ataca primero las células de los folículos de la Bolsa de Fabricius, Cooper, Burmester 1968 (31).

Si la bolsa se extrae por métodos quirúrgicos o se impide su desarrollo por inoculación de andrógenos o derivados, la enfermedad no desarrolla ante la falta de las células receptoras (*target*). Es por eso que a esta enfermedad se la denomina dependiente de la Bolsa de Fabricius.

Las células infiltrativas y proliferativas de tipo linfoblástico primitivo, algunas veces referida en la literatura como hemocitoblasto o de tipo hemocitoblástico, productoras además de gammaglobulina.

El concepto actual considera indispensable la presencia de células de la Bolsa de Fabricius para la aparición de la enfermedad, en la que primero ocurriría la transformación celular, y luego de un período de latencia, migraría a los tejidos viscerales proliferando en forma neoplásica.

Las aves bursectomizadas permanecen virémicas durante toda su vida, pero sin producción de tumores y una marcada incapacidad en la producción de anticuerpos neutralizantes. Sugiriendo una marcada dicotomía en transformación celular (oncogénesis viral) y multiplicación viral a nivel de hospedador, hecho que reafirma la existencia de más de un nivel de defensa, Schudel (88).

Todos los intentos realizados para reconstruir aves bursectomizadas con trasplantes de este órgano y así aclarar la patogénesis de la enfermedad, han resultado hasta hoy infructuosos, Schudel 1970 (88).

La transformación neoplásica en Bolsa de Fabricius es siempre intrafolicular, lo que facilita la diferenciación patológica con enfermedad de Marek en que la infiltración es interfolicular.

Los acúmulos linfoideos son extravasculares a diferencia de eritroblastosis en que son intravasculares.

El principal sistema afectado es el linfopéyico, con leucemia o no, aunque a veces el sistema hematopéyico está relacionado en forma directa (médula ósea), Hemboldt y Fredrikson 1968 (51).

15. Posibilidades de Control

Erradicación

La infección causada por virus del grupo Leucosis/Sarcoma ha sido erradicada en una serie de experimentos en poblaciones avícolas destinadas a propósitos experimentales.

Los resultados indican claramente que cuando la infección ha sido eliminada del plantel, no son necesarias medidas extremas de aislamiento para impedir la infección.

No hay vacuna utilizable, ni nunca se ha intentado su producción.

El que un programa de erradicación sea un procedimiento aplicable prácticamente depende de tres factores:

a) Costo del programa de test.
b) El grado de infección del plantel.
c) La posibilidad de reinfección.

Se han desarrollado varios sistemas de test para la detección de virus o anticuerpos de leucemia linfoidea, la mayoría depende de cultivo de tejido por lo que son relativamente caros.

A) Elementos de control

Test de RIF: Rubín 1960 (82).

Las bases fueron detalladas anteriormente.

Fue el primer test con que se contó en condiciones experimentales, y con el que se inició la producción de "SPF flocks", grupos de pollos libres de enfermedad (Specific Pathogen free flock). Los principales inconvenientes de este test son:

a) Un largo período de test.
b) Los fibroblastos de embrión de pollo deben ser mantenidos por largo tiempo en excelentes condiciones.
c) Sólo detecta virus de un subgrupo a la vez, por lo que para evitar errores hay que efectuar por lo menos tres test simultáneos (uno para cada subgrupo).

Test de COFAL: Sarma 1964 (85).

Es un test de fijación de complemento y depende de la presencia del antígeno específico de grupo en el núcleocapsid del virus. El antisuero utilizado para reconocer el antígeno problema, es producido en hamster, paloma o conejo. Como el antígeno *gs* es común a todos los subgrupos del grupo Leucosis/Sarcoma, se detectan todos los subgrupos con facilidad.

Test de L-R: Long-Rispens-Okazaki 1970 en prensa (60), Schudel 1970 (87).

Basado en la activación específica de las células L-R ya descripta. Cuando estas células crecen en presencia de un virus de leucosis sintetizan virus en forma completa que es fácilmente demostrable en cultivo de fibroblastos apropiados. En 12 días se pueden dar un resultado del test. El virus producido por las células puede inocularse en huevos, pollos o cultivo de células.

Permite identificar todos los miembros del grupo e individualizarlos. Es el más sensitivo de todos los test.

Test de inmunofluorescencia

Usado indistintamente para la detección de virus o anticuerpos de acuerdo al test empleado, es específico de subgrupo por lo que se deben utilizar sueros específicos a cada subgrupo.

Test de neutralización

Para la detección de anticuerpos, como dependen de las características de la cubierta externa debe utilizarse virus específico de cada subgrupo.

B) Resistencia Genética

Tal como mencionáramos en páginas anteriores la selección por resistencia a la infección es actualmente una buena posibilidad de erradicación de la enfermedad, o por lo menos para su control.

La erradicación probablemente ocurra antes de llegarse a un 100 % de resistencia. Sin embargo los criadores deben considerar distintos factores que pueden influenciar la economía de sus planteles, y tal vez considerar también que no sólo pueden seleccionar para el primer nivel de defensa sino para el segundo, o sea, la aparición de tumores.

II - ENFERMEDAD DE MAREK

Con el nombre de Enfermedad de Marek se describe a una enfermedad infecciosa y linfoproliferativa de las aves, conocida comúnmente por un gran número de sinónimos (neurolinfomatosis, parálisis de las aves, parálisis de Marek, etc.).

Pese a ser conocida por más de 50 años se la ha confundido en el diagnóstico de su forma patológica visceral con Leucosis Linfoidea, causada por un virus RNA como vimos anteriormente. Recientes adelantos en el estudio etiológico de Enfermedad de Marek justifican la separación llevada a cabo por Biggs en 1960 (11), de Leucosis Linfoidea.

Es una enfermedad de etiología viral, infecciosa y contagiosa en cuyo cuadro patológico intervienen formas neoplásicas del tejido linfoideo y procesos inflamatorios con una característica predilección por el sistema nervioso periférico.

Causada específicamente por un virus del grupo Herpes de características oncogénicas (DNA), aislada por varios grupos de investigadores en forma simultánea.

Las evidencias de oncogénesis producidas por un virus Herpes en Enfermedad de Marek aumenta la expectativa de los medios virológicos mundiales ya que podría adquirir gran importancia como modelo experimental. Hace no mucho tiempo se aisló un virus Herpes del adenocarcinoma de rana o tumor de Lucké Faucett D. W. 1956 (41) y Lunger P. D., 1965 (61) y en 1966 Raucher y col. (75) publican el hallazgo de un virus Herpes asociado a sistemas celulares de Linfoma de Burkitt. Por último Meléndez en 1970 (63) consigue la reproducción de linfomas de gran ma-

lignidad, en monos, empleando un virus Herpes.

Los virus Herpes están distribuidos en todo el reino animal y la relación virus y enfermedad (en nuestro caso neoplasia) debe ser tomada con cautela. Aun así el presente trabajo aporta suficientes evidencias como para confirmar la etiología viral de Enfermedad de Marek, aunque no aclarar definitivamente el problema de su actividad oncogénica.

1. Etiología

Churchill y Biggs en 1967 (32), aislaron un virus Herpes íntimamente asociado al sistema celular empleado (riñón de pollo) y simultáneamente Solomon J. y col. (93) en el Regional Poultry Research Laboratory East Lansing, aislaron un virus de características similares en cultivos de fibroblastos de embrión de pato. La caracterización final como virus Herpes la dio Nazerian en 1968 (66) (67), con microscopía electrónica en fibroblastos de embrión de pollo y pato.

Posteriormente se registraron aislamientos de virus Herpes de características similares a los ya mencionados confirmando los aislamientos iniciales.

En muy pocas oportunidades se han observado partículas de virus Herpes en tumores viscerales o lesiones neurales de la enfermedad, en cambio sí se observan con regular asiduidad en cultivo de tejidos obtenidos de aves infectadas con virus Herpes. Sin embargo se han observado partículas virales de tipo C en nervios y linfocitos, de casos de Enfermedad de Marek, Distéfano y Dougherty 1964 (36), Wight y col. 1967 (105).

En 1969 K. Cook (30), sugiere la existencia de Virus de Retículo endoteliosis (RE) y virus sinsicial respiratorio (SRV) en las preparaciones obtenidas de casos de enfermedad de Marek.

Estos datos son posteriormente rectificados ya que estos virus se presentaban como contaminantes de sus medios de cultivos y no correspondían a agentes etiológicos de Enfermedad de Marek.

En 1969 Witter y col. (107) aporta datos convincentes sobre la etiología de la enfermedad, aunque persiste en ellos la duda de la transmisión de la enfermedad por filtrados libres de células, que posteriormente fue aclarado como veremos más adelante.

Resumiendo, las evidencias circunstanciales de que un virus Herpes es el agente causal de enfermedad de Marek son los siguientes:

1. En todas las cepas de virus de Enfermedad de Marek fue posible aislar un virus Herpes, resultando negativo el intento de aislar virus Herpes de pollos mantenidos en condiciones de aislamiento.
2. Fue aislado en un 68 % de poblaciones avícolas con o sin historia de aparición de Enfermedad de Marek en forma clínica, Burmester 1969 (23).
3. Se aisló de 85 pollos sobre 86 con lesiones macro y microscópicas.
4. Se obtuvo una correlación del 87 % entre cultivos de células infectadas, con efecto citopatológico evidente, y producción de la enfermedad al inocular a pollos.

Por último, este virus Herpes recogido de folículo de pluma de pollos infectados, tratado convenientemente a fin de liberarlo de material celular, resultó altamente infeccioso, luego de la inoculación a pollos. Siendo ésta una prueba confirmatoria de que un virus Herpes es el agente etiológico de Enfermedad de Marek (MDV o MDHV), Nazerian y Witter 1970 (68).

En base a la morfología de la partícula viral, su contenido en ácido nucleico, actividad de inhibidores de síntesis y estrecha asociación celular el agente etiológico de Enfermedad de Marek ha sido clasificado como miembro del grupo B de los virus Herpes.

2. Propiedades Físicas

La partícula viral infecciosa corresponde por sus características morfológicas a un virus Herpes con 162 capsómeros y dos envolturas de naturaleza celular. Su ácido nucleico es DNA constituyendo la parte central de su nucleocapsid. Mide de 150-200 mu y es muy difícil observarlo en preparaciones libres de células. Nazerian 1970 (69).

El gradiente de densidad en cloruro de cesio del DNA viral, es de 1,716 gn/cm.^{3} a diferencia del DNA celular que es de 1,702 gn/cm.^{3}. Lee y col. 1970 (59), datos que corresponden a la cepa GA de Enfermedad de Marek muy similares a los obtenidos por el mismo grupo con la cepa JM.

3. Propiedades químicas

Lee y Nazerian, y Burmester 1970 (59), concluyen que para la cepa GA, asumiendo que la molécula de DNA es linear, la composición de bases es de 57 % de guanina más citosina en contraste a un 43 % de las mismas bases en el DNA celular.

La exacta proporción de constituyentes químicos y las características químicas de su envoltura externa no han sido aún determinadas.

Las observaciones primitivas de la inhibición de la síntesis viral por compuestos químicos, específicamente inhibidores de la síntesis del DNA, como 5-bromo-desoxiuridina y la constitución química de los corpúsculos de inclusión indican que esta enfermedad, es causada por un virus DNA, Churchill y Biggs, 1967 (32), Witter, Burgoyne, Salomon, 1968 (106).

4. Ultraestructura

El efecto citopatológico se manifiesta en cultivo de fibroblastos de embrión de pato y cultivo de células renales de pollo, algunas cepas dan efecto citopatológico en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo.

No hay evidencias de efecto citopatológico en células de mamíferos bajo las condiciones experimentales empleadas.

El efecto citopatológico se manifiesta por la formación de placas focales discretas. Las placas contienen células esféricas, predominantemente policariocitos, con cuerpos de inclusión intranucleares Felguen positivos indicando que la inclusión contiene DNA.

Es posible distinguir entre el efecto citopatológico producido por las cepas de virus de Enfermedad de Marek y la cepa vaccinal obtenida de pavo.

Pese a que hay gran similitud entre el efecto citopatológico sobre cultivo de fibroblastos de embrión de pato y riñón de pollo es posible establecer diferencias (cuadro Nº 7).

CUADRO Nº 7

	Efecto citopatológico	
— Tiempo luego de inoculación	Fibroblastos de embrión de pato 6-9 días	Riñón de Pollo 3-7 días
— Tamaño	Mayor de 1 mm.	Mayor de 0.5 mm.
— policariocitos esféricos	+	+
— células irregulares	+	—

En los cuerpos de inclusión intranucleares es posible observar partículas virales. La mayoría de las partículas virales observadas en el núcleo correspondían a viriones desnudos, aunque también se observan viriones completos pero dentro de vesículas nucleares. Parecería que en caso de replicación viral in-vivo la cantidad de virus con cubierta externa en citoplasma es mucho mayor a la replicación in-vitro y probablemente influiría en la eficiente salida de partículas virales infecciosas.

En coloraciones negativas de las partículas virales es posible observar una cubierta externa, núcleocapsid y un material filamentoso entre capsid y cubierta externa.

Aún se necesita mayor énfasis en los estudios ultraestructurales de la partícula viral.

En el epitelio de los folículos de pluma los cambios ultraestructurales con aparición de cuerpos de inclusión nucleares y gránulos citoplásmicos aparecen a nivel de la capa transitiva de la epidermis. Es posible observar inclusiones citoplásmicas con gran cantidad de partículas virales en su interior.

5. Purificación

Es imposible hasta hoy hablar de preparaciones purificadas, excepto en las experiencias de composición química ya mencionadas.

La estrecha asociación celular hace que desde el punto de vista práctico sea imposible encarar la obtención de materiales purificados sin una preparación viral de muy alto título ya que la infectividad del material disminuirá al encontrarse libre de elementos celulares.

Recientes investigaciones prometen ampliar el campo de posibilidades en esta área, ya que permitirán obtener material infeccioso libre de elementos celulares, empleando para ello virus extraído de los folículos de pluma de aves previamente infectadas, Nazerian y col. 1970 (68), Calnek 1969 (26).

6. Antigenicidad

Por inmunofluorescencia es posible identificar antígenos específicos en el citoplasma de células infectadas in-vitro o en epitelio de folículos de pluma, como en un gran número de tejidos correspondiendo esta fluorescencia a la presencia de partículas virales, Calnek 1970 (26), Purchase 1969 (74).

Al infectarse una célula renal, se forman nuevos antígenos a nivel de membrana celular, tal como ocurre en otros virus inductores de transformación celular, Chen, Purchase 1970 (27).

En el suero de aves infectadas se detectan hasta cuatro bandas de precipitación diferentes en el test de difusión en agar.

La infección viral determina la aparición de anticuerpos precipitantes en el animal hospedador. También la de anticuerpos fluorescentes.

7. Ocurrencia

En condiciones naturales, cuando la infección se establece en un plantel, 100 % de las aves son infectadas aunque no manifiesten síntomas clínicos o patológicos de la enfermedad.

Aparentemente los pollos están libres de infección al nacer, y si están infectados esto ocurre en muy bajo nivel, Witter 1970 (108), Sevoian 1968 (92). A los 9-16 días de edad comienza a detectarse virus circulante y en distintos tejidos, en aves inoculadas por vía intraperitoneal al nacer. Lo mismo sucede en aves expuestas en forma natural a la enfermedad al nacer. Las lesiones microscópicas aparecen entre las 4-5 semanas. Los anticuerpos precipitantes se detectan entre las 6-7 semanas.

Si se detecta la presencia de anticuerpos maternales, la respuesta se retrasa pero no disminuye el porcentaje de infección, aunque datos preliminares establecen una correlación entre mortalidad y presencia de anticuerpos maternos.

La extirpación de la Bolsa de Fabricius a edad temprana seguida de exposición natural a la enfermedad o inoculación no influye en la respuesta a la enfermedad, Payne 1970 (en prensa).

8. Trasmisión

La trasmisión horizontal de la enfermedad, es la forma más común y la de mayor implicancia epidemiológica, Sevoian 1968 (92), Witter 1970 (109) lo demostraron, pese a realizar conclusiones diferentes frente a resultados muy parecidos. El autor se solidariza con la opinión de Witter, ya que la trasmisión vertical de la enfermedad si existe es debida a condiciones excepcionales y no la vía natural de trasmisión.

Hasta el hallazgo de un virus libre de células a partir de epitelio de folículos de pluma, la trasmisión experimental de la enfermedad ocurre sólo en presencia de células viables.

El virus está presente en la cavidad nasal y oral de las aves infectadas, eliminándose por tracto digestivo, facilitando así una rápida diseminación de la enfermedad, Sevoian y Chamberlain 1963 (90), Witter y Burmester 1968 (106), Kenzy y Biggs 1967 (56).

Sobrevive por largos períodos en la suciedad de los gallineros y camas de pollos, Biggs y Payne 1967 (14), Witter, Burgoyne y Burmester 1968 (106).

El material obtenido de la descamación epitelial de aves enfermas es posible desecarlo y congelarlo, sin pérdida de la infectividad, por largos períodos de tiempo. Estos resultados, demostrados por Calnek, sumados a los de existencia de virus libre de elementos celulares en folículos de pluma, aclaran más el panorama epidemiológico de la Enfermedad de Marek, ya que esto significaría la vía de salida del virus del animal infectado. Las evidencias que hasta hoy tenemos, sugieren a las vías respiratorias como puerta de entrada del virus.

Se ha probado la existencia de virus infeccioso en un escarabajo de tierra, el Alphitabius diaperinus, lo que amplía aún más las consideraciones epidemiológicas.

No hay diferencias en mortalidad por Enfermedad de Marek en lotes de pollos vacunados contra encefalomielitis aviar y no vacunados, Davis, Dawe y Brown 1969 (35).

Mucho se ha hablado de la influencia de coccidiosis en Enfermedad de Marek y viceversa, pero hasta hoy, no hay absolutamente nada probado en ambos sentidos, varios intentos de investigadores reconocidos han fracasado rotundamente.

9. Patología

Desde el punto de vista clínico se reconocen dos manifestaciones de Enfermedad de Marek:

a) *Clásica*: Los nervios periféricos son los más afectados y por lo tanto las manifestaciones de parálisis y trastornos motores caracterizan a este cuadro.
b) *Aguda*: Con predominio de tumores viscerales y lesiones nerviosas menos frecuentes, el curso de la enfermedad es muy corto y la mortalidad es muy alta. Ataca frecuentemente pollos jóvenes y es propia de los modernos sistemas de explotación.

Diagnóstico: Se detallarán brevemente algunos caracteres de interés. El carácter diferencial de las lesiones de Enfermedad de Marek con las de Leucosis Linfoidea, será motivo de una publicación posterior.

Macroscópicamente, los nervios periférico, vago, ciático, braquial, celiaco, etc. y los plexos correspondientes son los más frecuentemente afectados, agrandados dos o tres veces su tamaño normal, o bien con pérdida de la coloración y estriación. Es frecuente la aparición de tumoraciones nodulares aisladas.

Las formas viscerales no son diferenciables en forma macroscópica de las de Leucosis Linfoidea, ya que ocupan la misma distribución a excepción de Bolsa de Fabricius. Los ór-

ganos más frecuentemente afectados son: ovario, hígado, riñón y bazo, con menor frecuencia pero sin ser excepcionales en pulmón, corazón, Bolsa de Fabricius, músculo esquelético e intestino.

Microscópicamente, las lesiones neurales están constituidas por células pleomórficas, linfocitos grandes, medianos y pequeños, células plasmáticas y un tipo celular aberrante conocido como células de Marek. Pueden parecer de tipo inflamatorio con edema y pequeños linfocitos o bien neoplásico en los casos avanzados de la enfermedad.

Pese a afectar el tejido hematopoyético, es alecucémica, y sólo puede parecer leucémica en los últimos estadios de la enfermedad. Generalmente son anémicos antes de morir.

En los órganos viscerales el pleomorfismo celular de las lesiones es el criterio más significativo para la diferenciación con Leucosis Linfoidea. Cambell en 1956, sostiene que la primera lesión observable a nivel microscópico es una necrosis focal con infiltración linfocitaria, negada luego por Biggs en 1965. Sin embargo a criterio del autor es un hallazgo bastante frecuente en casos tempranos de la enfermedad.

10. Control

Desde el punto de vista genético, Cole (29) demostró la posibilidad de obtener líneas resistentes y susceptibles en sólo dos generaciones.

Stone (95), del Regional Poultry Research Lab., indica que la mortalidad debida a Enfermedad de Marek está controlada por tres locus por lo menos y que resistencia es dominante sobre susceptibilidad. Comprobó además que la Línea 6 de ese laboratorio es muy susceptible a la infección, respondiendo con los títulos más altos de anticuerpos precipitantes pero es la más resistente al desarrollo tumoral, comparada con otras dos líneas y sus cruzas, sugiriendo un mecanismo de bases similares al que esta misma Línea 6 de pollos experimenta en Leucosis Linfoidea.

Casi todos los centros de investigación del mundo dedicados al estudio de Enfermedad de Marek tratan de encarar el control de la enfermedad por vía de la vacunación.

Hay tres tipos de cepas vacunales:

a) Atenuadas, obtenidas de pollo, sin trasmisión horizontal.
b) Atenuadas, obtenidas de pollo, con trasmisión horizontal.
c) Obtenidas de otro animal hospedador.

Al primer tipo corresponde la vacuna elaborada en el Houghton Poultry Lab., por Churchill y Chubb y Payne 1969 (33). Es una cepa atenuada por pasajes en cultivo de células renales de pollo. Da una protección bastante cuestionable, hasta hoy, pues en todos sus experimentos, pese a tener una buena exposición en sus aves control (sin vacunar), tienen una alta tasa de mortalidad en las aves vacunadas.

Rispens, comunicación personal (76), aisló una cepa atenuada de un brote de Enfermedad de Marek, luego de varios pasajes en cultivo de tejido, con el solo propósito de propagación, que al inocularse a pollos otorgaba una buena protección, y se trasmitia en forma horizontal; los resultados son hasta ahora satisfactorios, pese al escaso número experimental. Ofrece sin embargo la particularidad de su trasmisión horizontal, que si no se manifiesta por una mutación hacia patogenicidad, ofrecería características por demás interesantes, ya que inoculando unas pocas aves se lograría la protección de la totalidad del plantel.

En el Regional Poultry Research Laboratory de East Lansing, el equipo bajo el mando del doctor B. R. Burmester trabaja en base a una cepa de virus Herpes aislada de pavos, que es apatógena para pavos y para pollos. Posee componentes antigénicos comunes con el virus de Enfermedad de Marek, demostrables por inmunodifusión e inmunofluorescencia, pero

fácilmente diferenciable por su efecto citopatológico en cultivo de tejidos. Hay más de 380.000 aves inoculadas en condiciones de campo, con resultados hasta hoy altamente satisfactorios, pese a no lograrse una buena exposición, Okazaki, Purchase y Burmester 1970 (79).

Como inconvenientes comunes a las tres vacunas, es que necesitan de preparaciones celulares infecciosas como material a inocular, lo que dificulta el manejo de las cepas vacunales. su producción y traslado, inconvenientes que se obviarían con la posibilidad de liofilización sin pérdida de viabilidad viral en el procesamiento.

Otra posibilidad de control de la enfermedad es la aplicabilidad de la crianza de pollos en condiciones de aislamiento con presión positiva o negativa según el caso. Sólo una experiencia en condiciones comerciales de este tipo ha resultado satisfactoria, y todos los intentos de repetirla han resultado infructuosos. Que estos sistemas sean aplicables o no dependerá de:

1. Ausencia de transmisión vertical.
2. Procedimientos eficaces para eliminar la contaminación en los alojamientos.
3. Posibilidad de contar con alojamientos económicos que eliminen la infección del ambiente externo.

III - OTRAS SIN CLASIFICAR

Reticuloendoteliosis. (RE) o virus T

En 1958 Twiehaus (98), aisló un virus de un pavo adulto con lesiones de leucosis. Sevoian en 1964 (91) trabajando con este virus propone su introducción en el Complejo Leucósico Aviar, llamándolo virus T a la cepa de reticuloendoteliosis con que trabajó.

Zeigel en 1966 (110) demuestra que este virus induce reticuloendoteliosis en pollos, identifica a un virus de RNA, de 180 mu de diámetro, y muy parecidos a los de Leucosis Linfoidea. Multiplica en células endoteliales y emerge por gemación a través de la membrana celular.

Theilen en 1966 (97) demostró la patogenicidad para pollos, pavos y perdiz.

Finalmente Witter en 1970 (109), demostró la existencia de lesiones macroscópicas linfoproliferativas neurales similares a las causadas por enfermedad de Marek. Estas lesiones constan en su mayoría de células plasmáticas y pueden diferenciarse de las de Enfermedad de Marek. Sin embargo la falta de trasmisión horizontal de la enfermedad y su escasa patogenicidad en condiciones naturales posibilita la diferenciación de ambas enfermedades.

Como vemos, no hay suficientes conocimientos sobre reticuloendoteliosis como para incluirla junto a las enfermedades del Complejo Leucósico Aviar.

Agradecimiento: Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. B. R. Burmester, sin cuya cooperación y guía este trabajo no podría haber sido realizado. Al Dr. O. García, por sus agudas y productivas críticas

BIBLIOGRAFIA

1. *Ahlstrom, C. G.* Nat. Cancer Inst. Monogr. 17, 299-319. 1964.
2. *Alexander-Jackson.* Scient. Research, Dec. 22. 1969.
3. *Allison y Burke.* J. Gen. Microbiol. 27, (181-194). 1962.
4. *Bader.* Virology 22, 462-468. 1964.
5. *Bader.* Virology 29, 452-457. 1966.
6. *Bader.* Survival Carcinogenesis. Nagoya. Japón, pág. 144. 1966.
7. *Baluda.* Virology 32, 428-437. 1967.
8. *Bernhard.* Cancer Research 19, 491-509. 1958.
9. *Bernhard.* Bull. Cancer. 43, 407-422. 1956.
10. *Bell y Cambell.* J. Comp. Path. 71, 85-93. 1964.
11. *Biggs.* P. Brit. Vet. Journal. 117-326. 1960.
12. *Biggs.* P. Poultry Review. 1963.
13. *Biggs, P.* Advances in Cancer Research. Acad. Press. 1966.
14. *Biggs y Payne, J.* Nat. Cancer Inst. 39, 267-280. 1967.
15. *Bonard y Beard.* J. Nat. Cancer Inst. 23, 183-197. 1959.
16. *Bonard y Beard.* J. Nat. Cancer Inst. 30, 290-297. 1963.
17. *Burmester B. y Waters.* Poultry Science 35, 7-26. 1947.
18. *Burmester, B.* Poultry Science 35, 1089-1093. 1953.
19. *Burmester y Gentry.* Cancer Research 34, 42. 1954.
20. *Burmester y Fredrickson.* Acta Oncológica. 1961.
21. *Burmester, B. R.* Cold Harbor Sym. 27, 471-477. 1962.
22. *Burmester, B. R.* Agri. Res. Pub. Nº 44-195. 1967.
23. *Burmester, B.* Recent Results in Cancer Research. Springer Verlag. 1969.
    Inst. 41 ,373-382. 1968.
24. *Burmester y Walter,* J. Nat. Cancer Inst. 26, 511-518. 1961.
25. *Caparini.* Clin. Vet. Milan. 19, 433-435. 1896.
26. *Calnek, B. y Aldinger.* Avian Disease 14. 1970.
27. *Chen, L. y Purchase, G. H.* Virology 40, 410-412. 1969.
28. *Claude, J.* Cancer Research 7, 421-450. 1947.
29. *Cole.* En prensa. 1970.
30. *Cook, K.* J. Nat. Cancer Inst. 43, 203-212. 1969.
31. *Cooper, Burmester y col.* J. Nat. Cancer Inst. 41, 373-382. 1968.
32. *Churchill y Biggs.* Nature 215, 528-530. 1967.
33. *Churchill, Chubb y Payne.* Nature 221, 744. 1969.
34. *Crowford y Crowford.* J. Virology 13, 227-232. 1961.
35. *Davis, Dawe y Brown.* Avian Dis. Vol. XIII, Nº 4. 1969.
36. *Di Stefano y Dougherty.* J. Nat. Cancer Inst. 33, 921-934. 1964.
37. *Duesberg, P. P.* Nat. Acad. Science U.S.A., 54, 1511-1518. 1968.
38. *Ellerman y Bang, Badet.* Abt. I. Orig. 46, 595-609. 1908.
39. *Engelberth y Holm.* Acta Path. Micro. Scand. 37, 138-144. 1938.
40. *Elford y Andrews.* Brit. J. Exp. Path. 17, 422-430. 1936.
41. *Fawcett, D. J.* Bioph. Bioch. Cytol. 2, 725. 1956.
42. *Feldman y Olson, Biester y Swarte.* 1965.
43. *Furth, J.* Phisiol. Rev. 26, 47. 1946.
44. *Green y Beard.* J, Nat. Cancer Inst. 16. 163-172. 1955.
45. *Hageneau.* J. Nat. Cancer Inst. 20, 633-649 1959.
46. *Hageneau, J.* Microsc. I. 445-454. 1962.
47. *Hanafusa, H.* Proc. Nat. Acad. Science U. S. A., 51, 41-48. 1964.
48. *Hanafusa, T.* Virology 34. 1968.
49. *Hanafusa, H. y T. Hanafusa.* Virology 40. 1970.
50. *Heine, U.* J. Nat. Cancer Inst. 28, 41-105. 1962.
51. *Hemboldt y T. Fredrickson.* Nat. Cancer Inst. Mono. 32, 1968.
52. *Huebner, R.* P. Nat. Acad. Science U. S. A. 54, 742-749. 1963.
53. *Ishizaki y Vogt.* Virology 30, 377-384. 1966.
54. *Kahler, J.* J. Nat. Cancer Inst. 15, 337-339. 1954.
55. *Kelloff y Vogt.* Virology 29, 377-384. 1966.
56. *Kenzy y Biggs.* Vet. Record. 80, 565-568 1967.
57. *Langlois y Beard.* Cancer Research 26. 2056-2074. 1969.
58. *Lee, Roizman, Spear y Burmester.* Proc. Nat. Acad. Sci U. S. A. 64, 952-966. 1969.
59. *Lee, Nazerian y Burmester.* J. Virology, en prensa. 1970.
60. *Long, Rispens y Okazaki.* Avian Disease, en prensa. 1970.
61. *Lunger, P.* An. N. York Acad. Sci. 126-289. 1965.
62. *Marek, J.* Deuschetierarztl Wochschr, 15. 417-421. 1907.
63. *Melendez, L. y col.* Lab. Animal Care, 19, 372. 1969.
64. *Mladenov, J.* Nat. Cancer Inst. 38, 251-285. 1967.
65. *Moloney, J.* J. Nat. Cancer Inst. 34, 4-16. 1960.
66. *Nazerian, K. y col.* Proc. Soc. Exp. Biol. y Med. 127, 177-182. 1968.
67. *Nazerian, K.* Proc. Elec. Microscop. Soc. 26 th. Annual Meeting. 1968.
68. *Nazerian y Witter.* J. of Virol. 388-397. 1970.
69. *Nazerian, K.* Septime Congress Inter. de Micr. Elec. Grenoble. 1970.
70. *Okazaki, Purchase y Burmester.* Avian Disease 2, 413-429. 1970.
71. *Panima, G.* Vet. Ital. 8-33. 1957.
72. *Pappenheimer y col.* J. Exp. Med. 49, 63-102. 1929.

73. *Piraino, F.* Virology 32, 700-707. 1967.
74. *Purchase, G. H.* J. Virology 3, 557-565. 1969.
75. *Raucher, F. y col.* Cancer Research 26, 1176. 1966.
76. *Rispens, B.* Comunicación personal.
77. *Robinson, W. P.* Nat. Acad. Science U. S. A. 54, 137-144. 1965.
78. *Robinson y Duesberg.* Survival Carcinogenesis Monograph, in Tumor Viruses. 1967.
79. *Rolof.* Mag. ges Thbierheilk 34, 190. 1868.
80. *Rubín, H. y Temín, H.* Virology, 7, 75-91. 1959.
81. *Rubin, H.* Virology 11, 28-47. 1960.
82. *Rubín, H.* P. Nat. Acad. Science U. S. A. 46, 1105-1119. 1960.
83. *Rubín, Cornelius y Fanshier.* Proc. Nat. Acad. Science U. S. A. 47, 1058-1059. 1961.
84. *Rubín, H.* P. Nat. Acad. Science U. S. A., 60, 482. 1969.
85. *Sarma, P.* Nat. Canc. Inst. Monog. 17. 481-493. 1964.
86. *Sarma, P.* Virology 23, 313-321. 1964.
87. *Schudel, A. A.* Tesis para Magister Scientiae. Fac. C. Vet. 1970.
88. *Schudel, A. A.* En prensa.
89. *Sharp y Beard.* Biochem. Biophisy. Acta. 14, 12-17. 1954.
90. *Sevoian y Chamberlain.* Avian Dis. 7, 102-105. 1963.
91. *Sevoian, M.* Nat. Cancer Inst. Mono. 17, 99-119. 1964.
92. *Sevoian, M.* Poultry Science, 47, 1646 1968.
93. *Solomon, J. y col.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127, 173-182. 1968
94. *Steck y Rubin.* Virology 29, 642-655. 1966.
95. *Stone, H.* Comunicación personal.
96. *Temin, H.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 52, 322-329. 1964.
97. *Theilen, G.* J. Nat. Cancer Inst. 37, 730-743. 1966.
98. *Twiehaus, M.* Sin publicar. 1958.
99. *Vogt y Luykx.* Virology 20, 75-87. 1963.
100. *Vogt, P.* Advances in Virus Research. 11. Acad. Press. 294-374. 1965.
101. *Vogt y Ishizaki.* Virology 26, 664-672. 1965.
102. *Vogt, P.* Pro. Nat. Acad. Science. U. S. A., 58, 101. 1967.
103. *Weiss.* Virology 32, 719-730. 1967.
104. *Weiss, R. A.* J. Gen. Virol. 5, 511-533. 1969.
105. *Wight, P. A.* Nature 216, 804-805. 1967.
106. *Witter, R. y col.* Avian Dis. 12, 522-530. 1968.
107. *Witter, R. y col.* Avian Dis. 13, 171-184. 1969.
108. *Witter, R. y col.* Avian Disease 14, 1970.
109. *Witter, R. y col.* En prensa. 1970.
110. *Zeigel, R.* J. Nat. Cancer Inst. 37, 730-743 1966.