

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Determinación de anticuerpos contra el virus de la
reticuloendoteliosis aviar en gallinas ponedoras
mediante la prueba de ELISA**

TESIS

para optar el título de Médico Veterinario

AUTOR

Julia Melina Grados trinidad

Lima – Perú

2006

Agradecimientos

Agradecimientos:

*A Dios, por otorgarme la vida y las
fuerzas para seguir en el camino*

*A mis padres Carlos y Julia, y hermanas,
por su cariño, consejos y confianza*

*A mis abuelos por su ternura y compañía
en todo momento*

A mi tío Blas por su apoyo incondicional

*A mi familiares que me aconsejaron y brindaron
su apoyo*

*A la Dra. Eliana Icochea y Dra. Rosa Gonzáles, agradecimientos especiales
por su orientación, paciencia y enorme apoyo
en la realización de esta tesis*

*A los Dres. Elmer Dávila, Alfredo Condemarín,
Rafael Falcón, César Gavidia, Pablo Reyna y Alberto Manchego
por su asesoría y ayuda en la realización de esta tesis*

*A mi jurado, los Dres: John Guzmán, Hermelinda Rivera
y José Bustamante por sus consejos para la sustentación*

*A aquellos maestros que pasaron por mi vida,
por inculcarme valores y gratas enseñanzas*

*Al personal del Lab. de Patología Aviar, y a todos los doctores, dueños
y trabajadores de las granjas por su permisión y colaboración
para el desarrollo experimental de la tesis*

*A Erich, por ser mi aliciente, apoyo y compañía
en todo momento*

A Marthita, por brindarme la alegría de la mejor amistad

*A mis buenos amigos de la universidad, por su lealtad
y por compartir gratos momentos*

*A mis amigos Carlos, Josías, Jorge, Leo, por sus consejos
y apoyo en el ejercicio pre-profesional*

*A Hush y a todos aquellos seres como él que me llenaron
de sensibilidad, reforzando aún más
mi vocación profesional*

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE CUADROS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE ESQUEMAS	iii
APÉNDICE	iv
RESUMEN	v
SUMMARY	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Definición	3
2.2 Antecedentes	4
2.3 Etiología.....	4
2.3.1 Clasificación	4
2.3.2 Morfología y propiedades	5
2.3.3 Composición química	6
2.3.4 Replicación viral	8
2.3.5 Mutagénesis por inserción	9
2.4 Epidemiología.....	10
2.4.1 Distribución geográfica.....	10
2.4.2 Hospederos.....	10
2.4.3 Ocurrencia.....	11
2.4.4 Formas de transmisión	12
Transmisión vertical	12
Transmisión horizontal	13
Inoculación con biológicos contaminados.....	14
2.5 Vías de infección	15
2.6 Inmunidad	15
2.6.1 Inmunidad humoral.....	15
2.6.2 Inmunidad celular	16
2.6.3 Inmunidad tumoral.....	16
2.6.4 Inmunodepresión	17

2.7 Patogénesis.....	17
2.8 Lesiones clínico-patológicas.....	20
2.8.1 Neoplasia aguda de células reticulares.....	20
2.8.2 Neoplasia crónica de células linfoides.....	20
2.8.3 Síndrome del enanismo.....	21
2.9 Diagnóstico.....	22
2.9.1 Aislamiento e identificación.....	22
2.9.2 Pruebas serológicas.....	23
Prueba de Inmunoabsorbancia Ligada a Enzimas (ELISA)...	24
2.9.3 Diagnóstico diferencial.....	25
2.10 Control y prevención.....	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1 LUGAR DE ESTUDIO Y ANIMALES.....	28
3.2 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL.....	28
3.3.PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.....	29
3.4 TÉCNICA DE LABORATORIO.....	30
3.5 ANÁLISIS DE DATOS.....	31
IV. RESULTADOS.....	33
V. DISCUSIÓN.....	38
VI. CONCLUSIONES.....	44
VII. RECOMENDACIONES.....	45
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	46

LISTA DE CUADROS

	Pág.
CUADRO 1. Frecuencia de lotes de gallinas ponedoras comerciales seroreactoras al REV en Lima y La Libertad. Perú. 2004-2005.	35
CUADRO 2. Frecuencia de lotes de gallinas ponedoras comerciales seroreactoras al REV según antecedentes de problemas por tumores. Lima, La Libertad- Perú (2004-2005).	36
CUADRO 3. Frecuencia de lotes de gallinas ponedoras comerciales seroreactoras al REV según grupo etáreo. Lima, La Libertad-Perú (2004-2005).	36
CUADRO 4. Frecuencia de lotes de gallinas ponedoras comerciales seroreactoras al REV según grupo etáreo. Lima, La Libertad-Perú (2004-2005).	37
CUADRO 5. Porcentaje de sueros seropositivos a REV en los lotes seroreactores de gallinas ponedoras comerciales. Lima, La Libertad- Perú (2004-2005).	37

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1: Patogenie del virus de la Reticuloendoteliosis.....	19
Fig. 2: Kit comercial de ELISA para detección de anticuerpos contra el virus de la Reticuloendoteliosis (IDEXX).....	33
Fig. 3: Microplaca de la prueba de ELISA Indirecta con muestras seroreactoras de gallinas ponedoras.....	33

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
ESQUEMA 1. Conformación de los genes estructurales de los Retrovirus	7
ESQUEMA 2. Conformación de los genes estructurales del REV de transformación aguda.....	7
ESQUEMA 3. Conformación de los genes estructurales del REV de transformación lenta	7

APÉNDICE

	Pág.
APÉNDICE 1. Desarrollo de la técnica de ELISA indirecta.....	52
APÉNDICE 2. Identificación de los 42 lotes de gallinas ponedoras comerciales con los resultados obtenidos por lote mediante la prueba de ELISA Indirecta	53
APÉNDICE 3. Valores de densidad óptica obtenidos por cada muestra de los lotes evaluados mediante la prueba de ELISA Indirecta.....	54

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de anticuerpos contra el virus de la Reticuloendoteliosis (REV) en lotes de gallinas ponedoras utilizando la prueba de ELISA. Las muestras fueron colectadas durante los meses de julio del 2004 a marzo del 2005 y evaluadas en conjunto. Se tomaron 630 muestras de suero de 42 lotes en producción de 28 granjas comerciales provenientes de las zonas geográficas del departamento de La Libertad y la provincia de Lima. En los resultados obtenidos se hallaron 33.33% (14/42) lotes seroreactores; de estos, el 22.22% (6/27) provenían de Lima y 53.33% (8/15) de La Libertad; demostrando la presencia del virus en al menos 7% de la población estudiada que fue la prevalencia referencial utilizada. No se encontró asociación estadística significativa en las tres variables evaluadas: antecedentes de problemas tumorales, grupo étnico y línea genética. Este es un primer estudio realizado en gallinas ponedoras, cuyos resultados evidencian la presencia del REV en el Perú. Por lo tanto, se recomienda realizar monitoreos serológicos en diferentes zonas geográficas del país incluyendo otras especies aviares de crianza industrial, considerar a este virus como parte del diagnóstico diferencial ante la presentación de neoplasias en gallinas ponedoras, y realizar estudios posteriores para confirmar definitivamente el diagnóstico serológico.

Palabras clave: Virus de la Reticuloendoteliosis (REV), anticuerpos, prueba de ELISA, gallinas ponedoras.

SUMMARY

The objective of this study is to determinate the presence of antibodies against the Reticuloendotheliosis virus (REV) in flocks of layers hens using the ELISA test. The samples were collected in the period of July 2004 to March 2005 and were evaluated. It was taken 630 serum samples of 42 flocks in production of 28 commercial farms from geografic zones like the department of La Libertad and the province of Lima. In the results were found 33.33% (14/42) seroreactors flocks; of these the 22.22% (6/27) were from Lima and 53.33% (8/15) from La Libertad, showing the presence of the virus in 7% of the studied population that was the referential prevalence used. It was not founded a significative statistical association in the three studied variables: previous tumor problems, etareo group and genetic line. This is a first study made in layers hens, which the results show the presence of the REV in Peru. Therefore, it is recommended to make serologic operations in different geographic regions of Peru, including other avian species of industrial raising, to consider to this virus as part of the differential diagnostic in presence of neoplasias in layers hens and to realize later studies to confirm definitively the serologic diagnostic.

Key Words: Reticuloendotheliosis virus, REV, antibodies, ELISA test, layers hens

I. INTRODUCCIÓN

La industria avícola en el Perú ha incrementado su crecimiento durante los últimos diez años, generando alto rendimiento económico mediante la crianza comercial de gallinas para producción de huevos cuya población esta concentrada en la costa, en los departamentos de Lima, Ica y La Libertad. Sin embargo, los niveles de rendimiento productivo han sido afectados por la aparición de virus muy virulentos de la enfermedad de Marek y la emergencia del subgrupo J del virus de la Leucosis Aviar, agentes virales que además de ser inmunosupresores producen neoplasias, y que han incentivado a mejorar los niveles de bioseguridad en las granjas de postura en etapa de levante.

La presentación de enfermedades neoplásicas se ha incrementado notoriamente y la casuística a nivel mundial ha mostrado un incremento en la prevalencia de la infección por el virus de la Reticuloendoteliosis (REV) (Witter, 1997a; Manual Merck, 2000), un agente emergente que no había sido considerado en el diagnóstico diferencial de los tumores linfoides, sin embargo presenta similitud de lesiones con otros virus tumorales en las aves (Witter,1997a).

La Oficina Internacional de Epizootias (OIE) considera a la enfermedad neoplásica aviar producida por el REV, juntamente con los virus de la enfermedad de Marek y de la Leucosis Aviar, como importantes desde el punto de vista comercial, debido a las perdidas económicas generadas por la mortalidad y el bajo rendimiento productivo que ocasionan en las aves (Payne y Venugopal, 2000).

El REV se caracteriza por ser un retrovirus que involucra una variedad de síndromes patológicos, afectando un amplio rango de hospederos aviares (Witter, 1997a). Es actualmente prevalente en países de Europa, África, Asia y Norteamérica, incluyendo Australia. La transmisión horizontal y vertical, así como la intervención de mosquitos como vectores, complican las medidas necesarias para prevenir la propagación del virus en el medio (Payne y Venugopal,2000), desconociéndose algunos aspectos de la epidemiología por la capacidad del virus de insertarse en otros virus ADN aviares (Fadly et al, 2004).

Este virus ha incrementado el nivel de preocupación debido a las pérdidas económicas por decomisos relacionados con mortalidad, tumores y/o inmunosupresión, sin embargo actualmente, el problema radica por ser un agente contaminante potencial de vacunas a virus vivo aviar, llevando a las compañías de vacunas y productoras de parvadas libres de patógenos específicos (SPF) a mantener una vigilancia permanente de sus productos, y por otro lado REV se considera una barrera para la exportación de la progenie de lotes infectados, debido a la prohibición para exportarlos, obstaculizando así el comercio internacional de aves y sus productos avícolas (Witter,2000).

Actualmente se encuentran disponibles los kits comerciales de ELISA para la detección de anticuerpos en suero de pollos. Esta es una prueba inmunoenzimática eficaz rápida, sensible y muy útil para las detección de anticuerpos en aves positivas, y para confirmar la ausencia del virus en lotes libres de patógenos o, lotes que producen progenie para la exportación (Fadly,1997; Witter y Fadly,2003).

En el Perú, un estudio previo realizado por Salas (2005) en 12 lotes de gallinas reproductoras mayores de 50 semanas de edad, mostró en base a la interpretación como lotes que todos fueron negativos a la presencia de anticuerpos al REV, sin embargo se desconocía su presencia en gallinas de postura comercial. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de anticuerpos contra el virus de la Reticuloendoteliosis en lotes de gallinas ponedoras de la provincia de Lima y el departamento de La Libertad mediante la prueba comercial de ELISA.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 DEFINICIÓN

La Reticuloendoteliosis es denominada a un grupo de síndromes patológicos que se presentan en varias especies de aves, y es causada por la infección con los retrovirus del grupo de virus de la Reticuloendoteliosis (REV). La enfermedad incluye los síndromes: a) Síndrome del enanismo, b) Neoplasia crónica de los tejidos linfoides y otros, y c) Neoplasia aguda de las células reticulares (Payne, 1998; Witter y Fadly, 2003).

Los REV no defectuosos son responsables del enanismo y la enfermedad neoplásica crónica, ambas se presentan en forma natural. Sin embargo, no se conoce la presencia en el campo de la neoplasia aguda de las células reticulares, inducida sólo por la cepa T defectuosa; por lo tanto, aunque hace mucho tiempo se ha reconocido a esta cepa T como el prototipo REV, es claramente atípica al grupo (Witter y Fadly, 2003).

El Grupo REV constituye: al REV (cepa T), el virus sincitial del pollo, el virus de la anemia infecciosa del pato y virus de la necrosis esplénica (Calvert y Nazerian, 1994) además de cepas no defectuosas que continúan aislándose de pavos, pollos, patos, faisanes y gansos (Witter, 2000). Así es como se define la existencia de este grupo de enfermedades conocido como Reticuloendoteliosis, todas causadas por virus emparentados, siendo más importante el REV (Zavala 2005, referencia personal).

2.2 ANTECEDENTES

La cepa del REV aislada inicialmente, cepa T, se obtuvo de un pavo con linfomas viscerales en 1958 en los EEUU (Salem et al, 1989; Medina y Ghazikhanian, 1997) y se realizó el pasaje en forma seriada más de trescientos veces en pavos y pollos, sin embargo la publicación de estos datos estuvo retrasada debido a que no se reconoció la naturaleza singular de este aislamiento viral (Witter, 2000).

En 1964, Sevoian obtuvo el máximo pasaje de la cepa T, encontrándolo agudamente oncogénico, causando la muerte de pollos jóvenes de 6 a 21 días después de la inoculación. En 1966, una publicación de Theilen y colaboradores, confirmó la oncogenicidad aguda de la cepa T en pollos jóvenes, pavos y codornices japonesas, siendo así denominada la enfermedad de Reticuloendoteliosis en base a la predominancia celular en las lesiones neoplásicas (Witter, 2000; Witter y Fadly, 2003). En 1975 los brotes de Leucosis en pavos en Reino Unido y EEUU fueron relacionados con REV (Medina y Ghazikhanian, 1997). Purchase y Witter (1975) reportaron por primera vez el aislamiento de anticuerpos contra REV en lotes de pavos indicando que este virus puede ser causa potencial de los brotes naturales en esta especie.

Han sido aislados similares virus en patos: Necrosis Esplénica (NS) y Anemia Infecciosa (DIA) (Medina y Ghazikhanian, 1997). Estos virus no oncogénicos incluyendo al Virus Sincitial del Pollo (SC), tienen relación antigénica con la cepa T, según estudios de Purchase, y con esto se estableció el concepto de “grupo de virus REV” cuyas cepas tenían diferentes propiedades biológicas (Witter y Fadly, 2003).

2.3 ETIOLOGÍA

2.3.1 Clasificación

Los REV son retrovirus inmunológicamente, morfológicamente y estructuralmente distinto a los del grupo Leucosis/Sarcoma. Dentro de la clasificación de los retrovirus, los REV son un subgénero dentro del género de virus relacionados con la leucemia murina, mientras que el grupo de la Leucosis/Sarcoma aviar se clasifica en

su propio género (Witter,2000). El REV ahora es un especie de los virus tipo C de los mamíferos (mammalian C-type), del subgénero de los virus de la Reticuloendoteliosis (Ritchie et al, 1999).

La relación filogenética con los retrovirus del tipo C de mamíferos se basa en la morfología, secuencia de ácidos nucleicos, secuencia de aminoácidos de los principales polipéptidos, determinantes inmunológicos y patrones de interferencia de receptores (Witter y Fadly, 2003).

Los REVs poseen cepas de replicación defectuosa y de replicación competente o no defectuosa (Payne,1998; Manual Merck,2000) La cepa T (cepa defectuosa) producida en laboratorio, posee problemas en su replicación en los cultivos de fibroblasto de pollo y contiene un oncogén de origen celular (v-rel) (Witter, 2000). Las colonias de la cepa T producen oncogenicidad aguda, sin embargo necesitan una cepa T con replicación no defectuosa denominado REV de ayuda (REV-A) para su replicación, y que no posee propiedades oncógenas agudas (Medina y Ghazikhanian, 1997; Witter, 2000). El virus de replicación defectuosa se propaga pobremente, si es que lo realiza, en el tejido fibroblástico de pollo mientras que el REV de ayuda se propaga con facilidad en estos cultivos (Witter, 1992).

La replicación defectuosa y la oncogenicidad aguda parecen ser solo propiedades singulares de la cepa T. Todas las cepas hasta ahora halladas incluyendo la cepa T de virus colaborador no son defectuosas, es decir poseen replicación competente (Witter,2000).

2.3.2 Morfología y propiedades

Los retrovirus son virus ARN que poseen envoltura (Madigan et al, 2001), con morfología y medios de replicación peculiares (Murray et al, 1999). Las partículas virales del REV son típicas de los retrovirus, miden 100 nm de diámetro aproximadamente, y están cubiertas con proyecciones de superficie de cerca de 6nm de longitud y 10 nm de diámetro. Los viriones tienen una densidad de 1.16 a 1.18 g/mL en gradientes de densidad de sacarosa, que se diferencian de los virus de Leucosis/Sarcoma

aviar mediante su morfología en cortes delgados y por su densidad en gradientes de cloruro de cesio (Witter y Fadly, 2003).

El virus no es muy estable en el medio ambiente (Manual Merck , 2000). Ha sido relativamente estable a 4°C, pero a 37°C ha perdido 50% de la infectividad en 20 minutos, y después de una hora perdió 99%. Las células infectadas pueden almacenarse de manera indefinida con dimetilsulfoxido a -196° C (Witter, 2000).

Los diferentes aislamientos del REV son remarcablemente uniformes en antigenicidad y poseen similares propiedades estructurales y químicas (Witter, 2000; Fadly et al, 2004), sin embargo difieren en ciertas propiedades biológicas que incluyen patogenicidad y replicación in vivo (Witter, 2000; Witter y Fadly, 2003).

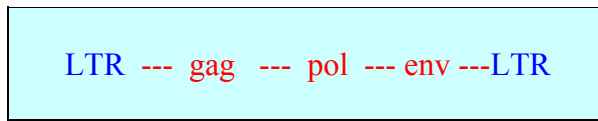
El REV pertenece a un solo serotipo, pero se han identificado tres subtipos antigénicos basados en las pruebas de neutralización y reactividad diferencial con anticuerpos monoclonales (Payne, 1998; Fadly et al, 2004). No se han reconocido secuencias de REV endógenos en el ADN de las células hospederas (Witter y Fadly, 2003; Fadly et al, 2004).

2.3.3 Composición química

El genoma consiste de ARN de una sola cadena (Ritchie et al,1999) que presenta el típico mapa genómico retroviral (Esquema N°1). El genoma del REV no defectuoso contiene 9 kb de peso, mientras que el REV defectuoso es de 5.7 kb, debido a la gran deleción en sus regiones estructurales (Witter y Fadly, 2003).

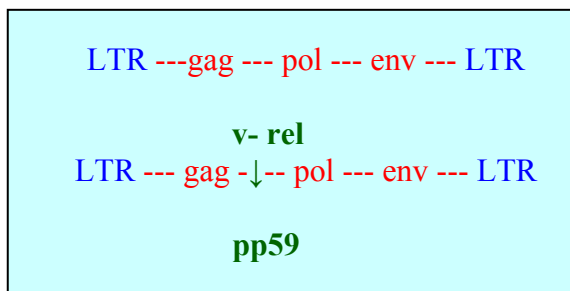
Los genes del REV, como otros retrovirus, contiene las regiones (genes) siguientes: *gag* que codifica proteínas estructurales internas, *pol* que codifica la polimerasa, y *env* que codifica las proteínas de la envoltura (Madigan et al, 2001). Además, las regiones regulatorias 5' y 3' denominadas terminales largas de repetición (LTR) consisten de 569 repeticiones de pares de bases, que son promotores eficientes en una variedad de tipos celulares (Witter, 2000). La cepa T con replicación defectuosa,

ESQUEMA N° 1. Conformación de los genes estructurales de los retrovirus

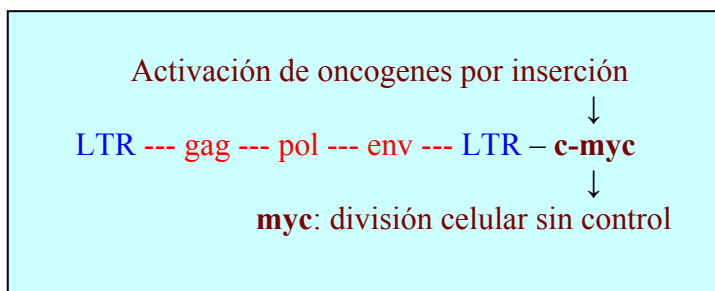


gag : proteína estructural interna
pol : polimerasa
env : proteína de envoltura
LTR: Repeticiones terminales largas.
Segmento con que el virus puede inducir tumores pero no tiene proteínas.

ESQUEMA N° 2. Conformación de los genes estructurales del REV de transformación aguda.



ESQUEMA N° 3. Conformación de los genes estructurales del REV de transformación lenta.



(Fuente: Zavala, 2004)

posee una gran deleción en la región *gag-pol* y una deleción menor en la región *env* (Witter, 2000). Además contiene una sustitución de la región *env* de 0.8 -1.5 kb que representa el gen de transformación u oncogén identificado como v-rel. Este oncogén es derivado de las células oncogénicas c-rel, presentes en el ADN de las células aviares normales (Payne, 1998).

El oncogen v-rel se transcribe en células linfoides transformadas por la cepa T, y origina un producto de fosfoproteína identificado como pp59^{v-rel} (Witter, 2000). Esta proteína es responsable de la oncogenicidad aguda de la cepa T con replicación defectuosa, considerada como la más virulenta de todos los retrovirus (Bose, 1992). Aun no está claro el mecanismo por el cual v-rel induce transformación (Witter, 2000) (Esquema N°2).

Se han reconocido cinco proteínas estructurales: p12, pp18, pp20, p30 y p10, y la glicoproteína gp90 que está localizado en la superficie de las células infectadas. Esta última es considerada la proteína inmunodominante de los virus. La p30 es la proteína más importante del grupo, establecido como antígeno de grupo específico, que participa en el ensamblado de las partículas virales (Moore et al, 2000; Witter, 2000).

2.3.4 Replicación viral

El ciclo de replicación viral es similar al de otros retrovirus, a través de un ADN intermediario usando la enzima transcriptasa reversa (Madigan et al, 2001).

Los REV con replicación no defectuosa ingresan uniéndose la glicoproteína de envoltura a un receptor específico en la superficie celular, aun no identificado, siendo probable que la entrada de los viriones se realice por fusión directa a la membrana celular. La integración del ADN proviral procede mediante mecanismos diferentes en células de pollo. La transcripción y traducción del ARN viral se inicia por medio de promotores y secuencias amplificadoras en el LTR. Se codifican las dos poliproteínas *gag-pol* y *env*, ubicándose en el gen *gag* la secuencia de formación de la cápside; la proteína precursora de este gen es miristilada. El último estadio es el nacimiento de las partículas virales a través de la membrana plasmática por gemación, produciéndose las

partículas virales a las 24 horas, y la producción máxima de virus, 2 a 4 días después de la infección en células de pollo (Witter, 2000).

Las cepas no defectuosas de REV son oncogénicamente lentas induciendo linfomas bursales en pollos (Jordan, 1990), debido a que la inducción de estos linfomas esta asociada a la integración en el ADN proviral del genoma del REV, del c-myc, un oncogén celular importante en la inducción de leucosis linfoide por el virus de Leucosis Aviar (VLA) (Payne, 1998). La inserción proviral con frecuencia contiene mayores deleciones que previenen la expresión del virus infeccioso (Witter y Fadly, 2003) (Esquema N° 3).

Los virus de cepa T con replicación defectuosa pueden transformar a las células hospederas pero no se producen partículas infecciosas (Ritchie et al,1999). Estos virus defectuosos requieren de un virus de ayuda (REV-A) para permitir su replicación. La propagacion en el laboratorio de la cepa T consiste en la replicación defectuosa del virus, que ha adquirido el encogen viral v-rel, conjuntamente con el REV de ayuda no defectuoso que necesita para su replicación (Jordan,1990). Esta cepa T es de transformación aguda, rápida y altamente oncogénica en pollos (Payne, 1998)., llegando a inducir Reticuloendoteliosis (Jordan,1990).

2.3.5 Mutagénesis por inserción

La replicación del REV requiere la integración de su ADN proviral en el genoma de la celula hospedadora, como en otros retrovirus. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el ADN proviral del REV puede integrarse espontáneamente al genoma de grandes virus ADN aviares como el virus de la enfermedad de Marek (VEM) y el virus de la Difteroviruela Aviar (VDA) (Witter y Fadly, 2003), proporcionando un nuevo método de mutagénesis insersacional (Witter, 1997a). Las inserciones provirales parecen ser el resultado de la coinfección del REV y un virus ADN receptor, ocurriendo tanto in vitro como in vivo. Muchas inserciones consisten de una sola porción del genoma del REV, por lo general LTR, que se encuentra en gran parte de las inserciones (Witter, 2000).

Existe evidencia que la infección múltiple con los retrovirus y el VEM puede ser sinérgica, siendo demostrada en el laboratorio la recombinación entre el REV y el VEM (Wakenell, 1997). La inserción completa del genoma del REV infeccioso se ha detectado en el Herpesvirus del pavo y la inserción parcial, en algunas cepas del VDA (Fadly et al, 2004). Esto demuestra el potencial de las inserciones del REV para cambiar las propiedades biológicas de los organismos receptores, pues los clones infecciosos del REV insertados en otros virus pueden proveer un nuevo mecanismo importante de transferencia de la infección (Witter y Fadly, 2003).

2.4 EPIDEMIOLOGÍA

2.4.1 Distribución geográfica

El REV no está generalizado, pero su distribución en varios países es mucho más amplia de lo que se creía en un principio (Manual Merck, 2000; Payne y Venugopal, 2000). A diferencia del VLA y VEM, no es hasta ahora ubicuo (Witter y Fadly, 2003). Según los estudios, parece ser especialmente prevalente en granjas de pollos y pavos de Israel, Australia, Japón y el sureste de EEUU (Jordan, 1990; Manual Merck, 2000), habiéndose descrito brotes también en Inglaterra (Witter, 2000).

2.4.2 Hospederos

La variedad de hospederos del REV es mucho mayor que los de la enfermedad de Marek (MD) o los de Leucosis Linfoide (LL) (Witter, 1997b, Manual Merck, 2000). Los hospederos naturales del REV incluyen a pavos, pollos, patos, gansos, faisanes, codorniz japonesa, y probablemente muchas otras especies aviares (Salem et al, 1989; Ritchie et al, 1999; Fadly et al, 2004). Los hospederos experimentales incluyen todas las especies antes mencionadas así como la gallina de guinea; siendo usados con mayor frecuencia los pollos y pavos (Witter, 2000). Los pavos son especies muy susceptibles; los pavos silvestres presentan una alta seropositividad y se han encontrado linfomas asociados con la infección por REV (Zavala, 2004). Los mamíferos parecen ser refractarios, aunque ciertos cultivos de células de mamíferos son susceptibles (Manual Merck, 2000).

2.4.3 Ocurrencia

La infección subclínica es moderadamente prevalente pero la infección clínica es poco frecuente (Witter, 1992; Witter, 1997b; Fadly et al, 2004). Los brotes naturales entre las aves son muy raros, excepto cuando están asociados al uso de biológicos contaminados (Witter, 1997a). La prevalencia de lotes seropositivos y la proporción de las aves seropositivas en un lote infectado se ve incrementado con la edad de la parvada (Witter y Fadly, 2003). Aunque algunos autores señalan que la incidencia de la enfermedad clínica asociada al REV en la avicultura comercial varía de esporádica a insignificante, la prevalencia de la infección por REV, medida por frecuencia de parvadas positivas es relativamente alta y puede incrementarse más en países como EEUU e Israel, donde la data es disponible. Esto se puede deber a la existencia de reservorios naturales de la infección, a parte de los lotes de pollos y pavos (Witter, 1997b). Además, los estudios indican mayor frecuencia de REV en zonas templadas o subtropicales que puede deberse a que las aves silvestres estarían actuando como reservorios naturales (Zavala, 2004).

El REV fue aislado por primera vez en pavos con neoplasia crónica pero actualmente la infección tiene mayor prevalencia en pollos (Witter, 1997a). Un estudio serológico en EEUU demostró infección por REV en 13.6% de 354 lotes de pollos y pavos comerciales, observándose una alta frecuencia de infección en los lotes de carne y postura (Witter et al, 1982). La infección parece haber sido endémica en Japón en 1964 (Witter y Fadly, 2003), y actualmente en varios países. Se indica la presencia de anticuerpos en 34-75% de los lotes de pollos en Corea y Egipto. En Japón y Australia, la presentación de linfomas crónicos y alta frecuencia de anticuerpos en pollos fue debido principalmente a la infección por REV por el uso inadvertido de vacunas contra el VEM contaminadas (Witter et al, 1982), y de manera reciente en EEUU (1996) se han relacionado linfomas en pollos reproductores de carne asociados con la vacuna de Difteroviruela aviar contaminada con este agente (Witter, 2000). La coinfección de pollos con el serotipo 2 del VEM ha incrementado la incidencia de los linfomas bursales del REV (Witter y Fadly, 2003). La presentación de contaminación accidental de

vacunas señala hacia un mecanismo adicional para incrementar la distribución del virus en la naturaleza (Witter, 2000).

En Israel, una evaluación serológica demostró que el 18.5 % de los lotes de polluelos importados entre 1990 y 1993 tenían anticuerpos contra REV. Los métodos de control realizados por este país sugieren que el monitoreo efectivo de la enfermedad usando ELISA y PCR en conjunción con una vigilancia estricta de la importación de aves de un día de edad reduce la incidencia del REV incrementando la rentabilidad de los lotes, sin embargo se requiere una mayor análisis acerca de la transmisión por vectores ambientales (Davidson y Malkinson, 1997). El rol de insectos mordedores como vectores de la infección esta siendo considerado debido a que pudiera existir una relación entre los altos índices de seroconversión producidos en los meses de verano, la alta prevalencia de la infección en los estados del sur de EEUU y la población de estos mosquitos (Davidson y Malkinson, 1997; Witter, 2000).

2.4.4 Formas de Transmisión

El virus es transmitido tanto vía vertical como horizontal. La transmisión horizontal se da tanto por contacto directo o indirecto (Witter, 1992; Davidson y Malkinson, 1997).

Transmisión vertical

La transmisión vertical se realiza mediante las células germinales o por la infección del oviducto (Davidson y Malkinson, 1997). Los pollos, pavos y patos infectados por inoculación embrionaria desarrollan infección tolerante con viremia persistente, de este modo las hembras infectadas tolerantemente pueden transmitir el virus a su progenie, aunque los índices reportados de diseminación y transmisión viral han sido bajos (Whiteman y Bickford, 1996; Witter, 2000; Witter y Fadly, 2003). Aunque, Motha y Egerton (1987) reportaron la transmisión en mas del 50% de pollos en un experimento en el que los huevos fueron incubados dentro de las 24 horas después de la postura.

Los pavos machos infectados con el virus tolerantemente pueden transmitirlo vía semen (Jordan, 1990), sin embargo el rol de los machos en esta transmisión necesita aun mas estudios (Witter y Fadly,2003). Mc Dougall et al (1981), hicieron un estudio inseminando a pavos con semen infectado y no infectados con REV, concluyendo que la incidencia de transmisión al huevo se incrementaba con el uso de semen infectado. En contraposición, Witter y Salter (1989) encontraron que la frecuencia de transmisión vertical no era mayor en gallinas cruzadas con machos virémicos de aquellos cruzados con machos sin viremia.

Los porcentajes de transmisión vertical son generalmente más bajos para REV que para ALV. Las aves infectadas semanas después de su nacimiento serocovierten pero no difunden el virus en el oviducto, siendo la infección por REV limitante y con dificultades para mantenerse en la progenie, sin embargo, se requieren más estudios (Witter, 1997b).

Transmisión horizontal

La transmisión horizontal es probablemente más importante que la vertical (Manual Merck, 2000). Experimentalmente, REV se puede transmitir por contacto directo con pollos, pavos y patos infectados (Witter y Fadly, 2003).La diseminación viral se produce probablemente durante el periodo de viremia aguda (Witter, 2000).

La transmisión horizontal puede estar influenciada por la especie del hospedero y la cepa del virus (Witter y Fadly, 2003). Se presenta generalmente en aves jóvenes cuando el virus es difundido por las heces y fluidos corporales (Ritchie et al, 1999). Las fuentes ambientales de infección pueden incluir galpones contaminados, insectos y otros reservorios biológicos. El virus se ha detectado también en escobas de limpieza, material de cama, hisopados de cloaca (Taylor et al 1997; Manual Merck, 2000). La presencia del virus en el ambiente del galpón, transportado por fomites, o por una mala desinfección, es una fuente potencial de infección para otros lotes (Witter y Fadly, 2003).

La transmisión por insectos es otra posible forma de transmisión horizontal. Motha y colaboradores, demostraron la transmisión aparente de la infección a pollos receptores y expuestos a *Culex annulirostris* que habían sido alimentados antes de aves con viremia persistente (Motha et al, 1983; Ritchie et al, 1999). Davidson y Malkinson (1997) encontraron que los mosquitos alimentados con sangre contaminada pueden transmitir el REV por cortos periodos de tiempo, siendo identificados también *Triatoma infestans* y *Ornithodoros moubata*. Se pueden considerar también nuevos reservorios del virus, tales como el virus de la Difteroviruela aviar que pueden contener clones infecciosos del REV y que pueden ser transmitidos por mosquitos (Witter y Fadly, 2003).

Inoculación con biológicos contaminados

El virus puede diseminarse mediante el uso de agujas contaminadas en la administración de antibióticos y vitaminas en los galpones, así como por inoculación con vacunas contaminadas (Witter, 1997b). La contaminación accidental con REV de vacunas a virus vivos de Difteroviruela Aviar y la Enfermedad de Marek (EM), ha sido reportada en varias ocasiones (Davidson y Malkinson, 1997; Witter y Fadly, 2003), incluyendo la vacuna para el Herpesvirus en pavos (Medina y Ghazikhanian, 1997).

El REV ha sido descubierto en algunas vacunas de aves, aunque infrecuentemente. Recientemente, REV no ha sido detectado en vacunas autorizadas en los EEUU. Ciertos estudios indican que el peligro primario de contaminación de vacunas a virus vivo con REV ocurre durante el aislamiento inicial del virus de la vacuna. La fuente mas probable de REV extraño, son los virus patrón para la vacuna que llegan de material infectado con REV. Los huevos embrionados o cultivos tisulares usados para realizar vacunas de aves llegan de lotes libres de patógenos específicos monitoreados serológicamente por la presencia de REV. Por lo tanto la contaminación con REV no parece ocurrir durante la producción de la vacuna (Taylor et al, 1997).

2.5 VÍAS DE INFECCIÓN

La infección con REV en el hospedero susceptible puede seguir dos caminos que determinen las lesiones patológicas:

La **infección tolerante**, que produce viremia persistente con ausencia de anticuerpos. Es inducido mediante inoculación embrionaria en aves (Witter, 1997b) y por transmisión vertical del virus a partir de hembras infectadas. También se presenta en pavos. Esta infección es poco probable que se presente en edades avanzadas (Witter y Fadly, 2003). Puede desarrollarse después de la inoculación, en el momento de nacer, pero el índice de inducción es variable (Witter, 2000). La infección tolerante se asocia con la transmisión vertical y desarrollo de tumores, encontrándose las aves inmunosuprimidas (Witter, 1997b; Witter y Fadly, 2003).

La **infección con viremia transitoria** seguida del desarrollo de anticuerpos. Se desarrolla en aves inoculadas o expuestas después del nacimiento. Mediante esta infección las aves muestran seroconversión, no difunden virus en el oviducto, y no desarrollan inmunosupresión o neoplasias (Witter, 1997b). Esta infección en aves adultas raramente resulta en enfermedad clínica excepto en pavos en los que se observan linfomas después de la exposición (Witter y Fadly, 2003).

2.6 INMUNIDAD

La infección con REV induce una alteración permanente o transitoria del sistema inmune. (Ritchie et al, 1999). La magnitud de la depresión de anticuerpos está influenciada por la dosis y la cepa del virus, y las respuestas primarias se encuentran más afectadas que las secundarias.(Witter y Fadly, 2003).

2.6.1 Inmunidad Humoral

Las aves con infecciones no tolerantes desarrollan fuerte respuesta de anticuerpos; siendo detectados a los 16- 21 días luego de la inoculación en pollos, sin embargo puede requerirse de 6 – 10 semanas en aves expuestas por contacto. Los anticuerpos

precipitantes e inmunofluorescentes pueden declinar con la edad (Witter, 2000). Según estudios realizados por Witter los anticuerpos son inducidos en frecuencias distintas y persisten por periodos variables (Witter, 1992). Estudios de McDougall et al (1980) detectaron en pavos infectados de manera experimental, la presencia de anticuerpos neutralizantes en alta frecuencia hasta las 40 semanas de edad. Las aves con infecciones tolerantes no desarrollan respuesta inmune humoral, aunque en algunos casos han desarrollado seroconversión, que pueden indicar una liberación de la tolerancia (Witter, 2000). La presencia de anticuerpos puede influenciar la susceptibilidad tumoral (Witter y Fadly, 2003). Los anticuerpos maternos se pueden detectar en pollos recién nacidos de madres expuestas. La resistencia a la enfermedad clínica relacionada con la edad es aparente. Además los anticuerpos maternos parecen limitar la susceptibilidad a la infección (Witter, 2000).

2.6.2 Inmunidad celular

En pollos inoculados con cepas de REV defectuosas o no defectuosas, se ha descrito la citotoxicidad restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), en contra de líneas celulares linfoblásticas transformadas con REV defectuoso, a los siete días luego de la inoculación. Esta respuesta parece estar mediada por activación de células T CD8+ activadas (CMHII+); pero no por las células NK. (Witter y Fadly, 2003). La estimulación de la mitosis de los linfocitos B y T se encuentra inhibida, así como la actividad citotóxica de los linfocitos T (la porción del sistema inmune dirigido contra las células neoplásicas) (Ritchie et al, 1999). La inducción de células T citotóxicas por REV se ha utilizado como un indicador general de respuesta inmune en estudios de otros virus aviares (Witter y Fadly, 2003).

2.6.3 Inmunidad tumoral

Los pollos inmunizados con preparaciones purificadas o inactivadas del virus de ayuda de la cepa T no defectuosa, fueron protegidos contra el desarrollo de tumores, debido a la presencia de antígenos de transplante específico en células tumorales reticuloendoteliales, siendo así resistentes al desafío con preparaciones de la cepa T de transformación aguda. (Witter y Fadly, 2003).

2.6.4 Inmunodepresión

Las respuestas inmunes celular y humoral se encuentran frecuentemente deprimidas en aves infectadas con cepas del REV no defectuoso (Witter y Fadly, 2003). La infección en neonatos o aves jóvenes que no son inmunocompetentes desencadenan inmunosupresión ocasionando una proliferación rápida de células con el oncogén adecuado (Witter, 1992). Además, se ha encontrado que las distintas cepas de REV no defectuosos variaron en su capacidad para inducir atrofia bursal y en supresión de poblaciones de células B disponibles para transformación por v-rel. Se ha demostrado interferencia, por la infección REV, con la inmunidad inducida por el virus herpes del pavo contra la MD en pollos. También se aprecia inmunosupresión humoral en patos infectados con un aislado viral de RE en campo (Witter, 2000).

La inmunodepresión ocasionada en campo, es probablemente la consecuencia más importante de la infección por REV en embriones o vacunas, pero es menos probable que resulte por infección por contacto y no se ha asociado comúnmente a lotes seropositivos (Witter y Fadly, 2003).

2.7 PATOGÉNESIS

El virus ingresa al organismo y se replica inicialmente en las células reticulares y endoteliales de las paredes de los capilares. No hay conocimientos detallados del mecanismo de entrada en la célula hospedadora, pero receptores diferenciados están indicados para reacciones diferentes en diversas líneas genéticas de hospederos. Después de la adhesión del virus se realiza la proliferación celular originada de células tipo mesenquimales primitivas o reticulares asociado con tejido linfoide. El tipo celular es el mismo en todas las aves susceptibles. Estas células en proliferación también pueden invadir el tejido nervioso (Ritchie et al, 1999). Se ha reportado neuritis linfocitaria periférica, lesión asociado a REV en el tejido nervioso (Zavala 2005, referencia personal).

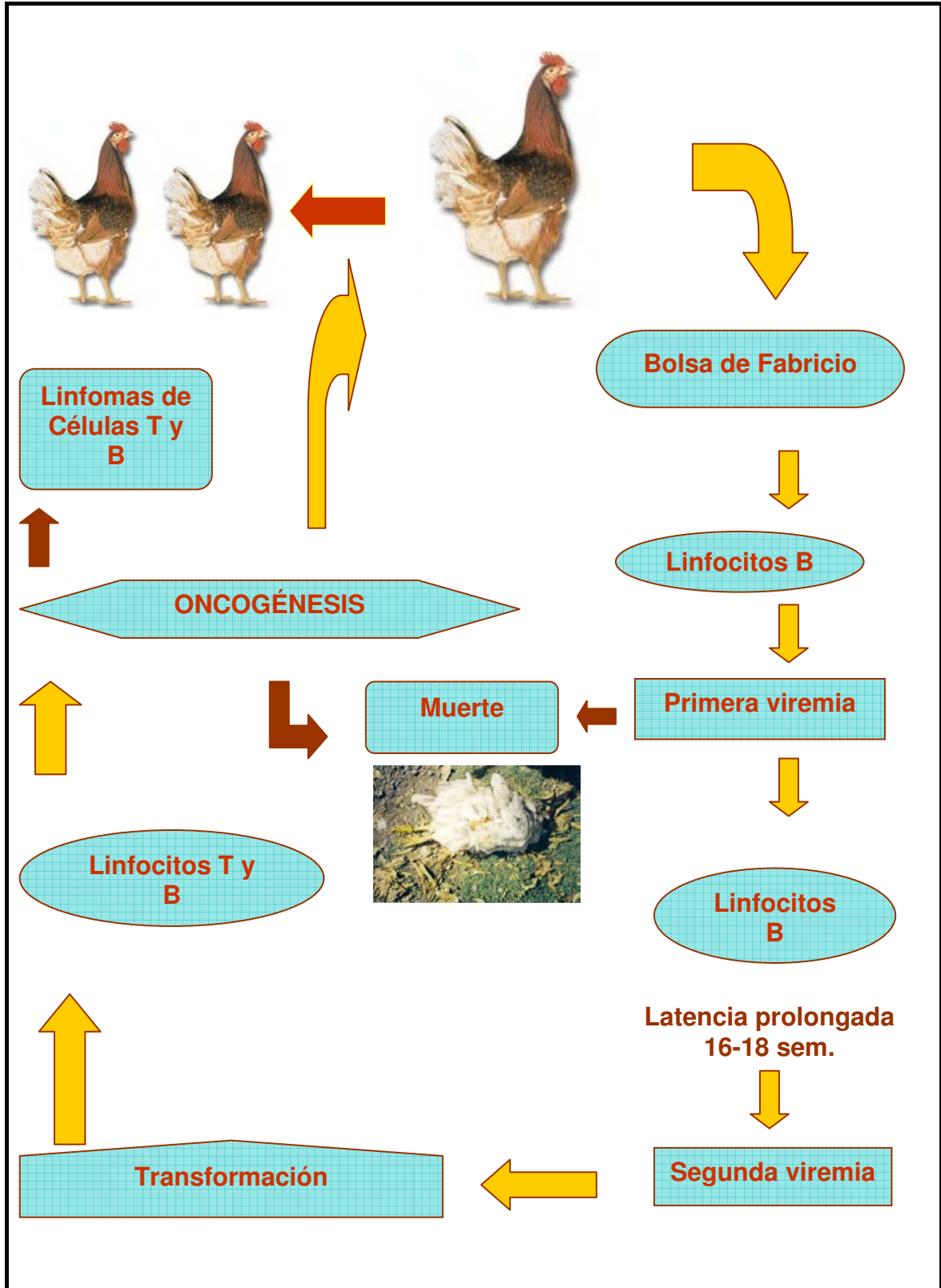
Los macrófagos se presentan como la primera línea de defensa ante el ingreso del virus, llevándolos a la bursa (linfocitos B) que ocasiona una primera viremia e

inmunosupresión, ocurriendo luego un periodo de latencia largo de 16 a 18 semanas. Luego de esto se produce una segunda viremia, que luego dará lugar a la transformación (Zavala, 2004). Algunas cepas de REV pueden inducir severa inmunosupresión y muerte temprana sin inducir tumores (Fadly y Witter, 1983). Las células blanco son aun inciertas, pero parecen ser células reticulares o células inmaduras B y T (Jordan, 1990). Las células linfoides transformadas por la cepa T in vitro, pero que no produce virus infeccioso, originarán reticuloendoteliosis típico cuando se transplanten en receptores singénicos (Witter, 2000) (Figura N° 1).

Las neoplasias crónicas de células linfoides en pollos que son inducidas por cepas no defectuosas de REV, producen dos tipos de linfomas: los bursales o derivados de células B, y los linfomas no bursales o derivados de células T (Fadly, 1997). Las aves inoculadas con la cepa T de replicación defectuosa, que sobrevivieron a la enfermedad aguda, pueden desarrollar lesiones asociadas con la cepa T no defectuosa del virus de ayuda (Witter y Fadly, 2003). En los linfomas bursales, las células tumorales se identificaron como células B mediante Ig M y otros marcadores específicos de células B, desde estas células blanco el virus se extiende al hígado y otros órganos (Payne, 1998). Es necesario un periodo no menor de 4 semanas de las células infectadas en la bursa para inducir linfomas (Fadly y Witter, 1983). Los linfomas no bursales se inducen cerca de 3 semanas luego de la inoculación, no habiéndose presentado en campo (Witter y Fadly, 2003). No hay evidencia que exista un mecanismo común de oncogénesis entre los linfomas crónicos de pavos y pollos (Witter, 2000).

El síndrome del enanismo constituye diversas lesiones no neoplásicas relacionadas con aves infectadas con REV no defectuoso (Jordan, 1990; Witter, 2000). Las aves sin desarrollo no consumieron menos alimento pero tuvieron una reducción en grado alto de la fosfoenolpiruvato carboxicinas, enzima gluconeogénica clave en el hígado. El desarrollo anormal de plumas se manifiesta debido a la necrosis inducida por REV de las células formadoras de plumas. Aún no está claro si las lesiones proliferativas en los nervios periféricos agrandados son producidas por células neoplásicas o inflamatorias (Witter y Fadly, 2003).

Fig. 1: Patogenie del virus de la Reticuloendoteliosis



2. 8 LESIONES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Los signos clínicos más comunes son los linfomas crónicos y el síndrome de la enfermedad del enanismo (Calvert y Nazerian, 1994) sin embargo la presentación clínica no es observada frecuentemente (Fadly et al, 2004). No hay signos patognomónicos observados durante el desarrollo de la neoplasia aguda o crónica. (Jordan, 1990; Witter,1992).

2.8.1 Neoplasia aguda de células reticulares

Los pollos o pavos recién nacidos que desarrollan neoplasia aguda de células reticulares luego de la inoculación con la cepa T defectuosa muestran raramente signos clínicos, y los porcentajes de mortalidad frecuentemente llegan al 100%.(Witter, 2000; Witter y Fadly, 2003). El período de incubación puede ser de tres días, pero se produce generalmente la muerte de 6 a 21 días luego de la inoculación (Jordan,1990; Payne, 1998; Witter y Fadly, 2003). La patología de esta neoplasia está bien estudiada. Comprende el desarrollo de hepatomegalia y esplenomegalia, causado por la infiltración local y difusa, por la proliferación de células reticulares y algunos linfocitos. Estas infiltraciones son comunes en el páncreas, gónadas, corazón y riñón (Jordan, 1990; Witter y Fadly, 2003). La sangre muestra una disminución de heterófilos e incremento de linfocitos, que conduce a una leucemia franca, una cuantas horas antes de la muerte. Histopatológicamente se hallan células mononucleares del sistema reticuloendotelial o células mesenquimales primitivas. Las áreas de necrosis asociada a las lesiones neoplásicas son frecuentes (Jordan, 1990).

2.8.2 Neoplasia crónica de células linfoides

Las aves no presentan signos clínicos específicos y causan esporádicamente mortalidad significativa (Medina y Ghazikhanian, 1997). Las respuestas neoplásicas crónicas se presentan después de un período de incubación relativamente largo (Witter y Fadly, 2003).

Los linfomas bursales o bursodependientes son patológicamente idénticos a los del VLA, que ocurre luego de un período latente largo (Jordan,1990; Payne, 1998) desarrollándose a las 17 a 43 semanas post inoculación. Los linfomas bursales, presentan lesiones nodulares o difusas en el hígado y otros órganos viscerales, incluyendo la bursa de fabricio, similares a los del VLA (Witter y Fadly, 2003). Pueden presentarse focos necróticos en hígado similares a la histomoniasis (Zavala 2005, referencia personal). Las células tumorales observadas histológicamente como poblaciones uniformes de linfoblastos, fueron identificados como células B (Witter y Fadly, 2003).

Los linfomas no bursales ocurren experimentalmente presentando un periodo latente no menor de 6 semanas (Payne, 1998). Se presentan infiltraciones linfoides difusas o locales, que producen aumento de tamaño de timo, bazo e hígado o lesiones focales del miocardio (Witter, 2000). Las lesiones no comprometen la bursa cloacal (Payne, 1998). Las células tumorales se observan como poblaciones uniformes de células linforreticulares inmaduras que carecen de marcadores de células B (Witter y Fadly, 2003), siendo tumores similares a los causados por el VEM (Jordan, 1990). En los pollos con linfomas no bursales se puede observar engrosamiento de los nervios originado probablemente por la expresión concomitante en aves con síndrome del enanismo (Witter, 2000; Zavala, 2004).

En pavos, los tumores linfoides son causados natural y experimentalmente (Payne, 1998). En gansos la inoculación induce linfomas agudo y crónico. En patos, la infección experimental causa enanismo, tumores linfoides y sarcomas. (Jordan,1990) Las células neoplásicas son grandes y uniformes, pero su linaje no ha sido caracterizado aún (Witter, 1992; Payne, 1998).

2.8.3 Síndrome del enanismo

El síndrome del enanismo incluye un número de enfermedades no neoplásicas que no son expresadas y varía según la cepa y otros factores (Witter y Fadly, 2003). El síndrome del enanismo se observa a las 4 -10 semanas después de administrar vacunas contaminadas a polluelos de un día de vida (Manual Merck, 2000). Las lesiones en

pollos incluyen crecimiento retardado, atrofia del timo y bursa de Fabricio, desarrollo anormal de las plumas, agrandamiento de los nervios periféricos, proventriculitis, enteritis, anemia y necrosis del hígado y bazo. Frecuentemente acompañadas por una depresión de la respuesta inmune celular y humoral (Witter y Fadly, 2003).

Los cambios de atrofia en la bursa y timo se pueden observar a partir de los tres días luego de la infección, y la depresión en el peso puede ser detectada a las 6 semanas de edad (Witter, 2000). Los pollos se observan con falta de desarrollo y pálidos, y el peso se reduce entre 20 y 50% entre la tercera y quinta semana post-infección, pudiendo persistir toda la vida (Witter y Fadly, 2003). Algunas aves muestran desarrollo anormal del plumaje “nakanuke”, es decir, las plumas de las alas tienen adherencias de la arista a una sección localizada del folículo o eje de la pluma. Las aves pueden mostrar en algunas ocasiones debilidad o parálisis (Witter, 2000). Algunos casos de infiltraciones de nervios periféricos por células linfoides y plasmáticos, conducen al aumento de tamaño de estos nervios. Las lesiones en los nervios pueden ser acompañados por linfomas en otros órganos (Jordan, 1990) aunque no es frecuente. La mortalidad es rara en pollos pero las aves afectadas en lotes comerciales se encuentran usualmente en el período de saca (Witter y Fadly, 2003).

2.9 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico se basa en la observación de lesiones generales típicas y microscópicas así como la constatación de la presencia del virus; mediante demostración de antígenos virales y ADN proviral en células tumorales (Witter y Fadly, 2003).

2.9.1 Aislamiento e identificación

El virus puede aislarse mediante el cultivo de la muestra en medios tisulares susceptibles (Witter y Fadly, 2003). Los inóculos más adecuados son preparados de sangre entera, plasma, bazo fresco y tejido tumoral de pollos con lesiones sospechosas (Witter, 1992; Ritchie et al,1992), siendo más adecuados, los inóculos celulares a los inóculos libres de células ya que los primeros suelen contener títulos más elevados del

virus que los últimos. Los cultivos deben mantenerse por lo menos mediante dos pasajes ciegos de siete días (Witter, 2000) debido a que los efectos citopáticos no pueden observarse en aislamientos primarios (Ritchie et al, 1999; Witter y Fadly, 2003). Para confirmar la presencia del antígeno viral usando anticuerpos monoclonales o policlonales, se utiliza inmunofluorescencia e inmunoensayos enzimáticos (Witter, 1992), pruebas más sensibles, además de tinción de inmunoperoxidasa y fijación de complemento.

La identificación del aislamiento se puede realizar mediante la reproducción de la enfermedad en animales experimentales, pruebas de neutralización, detección de ADN proviral mediante PCR. Este último es considerado un método sensible y específico para la detección de diferentes cepas de fibroblastos de embriones de pollos infectados, siendo útil también para el diagnóstico de tumores (Witter y Fadly, 2003) y la evaluación de vacunas con posible contaminación con REV (Taylor et al, 1997; Witter, 2000).

2.9.2 Pruebas Serológicas

La confirmación de la infección por REV involucra la detección de anticuerpos en el suero de pollos inoculados con aislamientos sospechosos o de pollos naturalmente infectados (suero o yema de huevo) (Witter, 1992). Estas pruebas serológicas son particularmente útiles para confirmar la ausencia de exposición viral en lotes de aves libres de patógenos o lotes que producen progenie para la exportación (Fadly, 1997; Witter, 2000; Witter y Fadly, 2003). Jordan (1990) refiere que el diagnóstico serológico de la presencia de REV es necesario para corroborar el diagnóstico patológico. La incidencia de aves seropositivas en lotes infectados varía considerablemente. La prueba más sensible para la detección de anticuerpos es la neutralización viral (Witter y Fadly, 2003), sin embargo requiere un cultivo celular prolongado. Las pruebas de precipitación en agar gel pueden detectar antígenos virales y anticuerpos en el suero, el único inconveniente es que no es muy sensible y requiere grandes cantidades de antígeno purificado. En la prueba de inmunofluorescencia para detección de anticuerpos la identificación del foco fluorescente de las células que llevan el antígeno puede ser equívoca frecuentemente (Smith y Witter, 1983).

Prueba de Inmunoabsorbancia Ligada a Enzimas (ELISA)

Las pruebas inmunoenzimáticas han demostrado ser un método eficaz en la medición cuantitativa de las concentraciones de anticuerpos contra el REV y facilitan el control de la condición inmunitaria en grupos grandes (IDEXX Lab, 2000). La prueba de ELISA es un método inmunoenzimático muy utilizado en condiciones de campo debido a su simplicidad, rapidez, bajo costo y debido a que un gran número de muestras pueden ser examinados en el mismo tiempo (Marie y Comte, 2000), evitando las desventajas inherentes de otras pruebas serológicas. Comercialmente se encuentran los kits de inmunoensayo enzimático de detección de anticuerpos (Witter,1997b; Witter y Fadly,2003).

La prueba de ELISA indirecta ha resultado ser más sensible que la prueba de inmunofluorescencia indirecta, y los límites de detección de anticuerpos han sido comparables a los obtenidos por la prueba de neutralización viral. Mediante la prueba de ELISA los anticuerpos contra el virus de la cepa T no defectuosa y el virus sincitial del pollo fueron rápidamente detectables en casi todos los pollos evaluados a las 20 a 33 semanas luego de la infección (Smith y Witter, 1983). Esta técnica realizada en pavipollos de 2 días de edad o en las yemas de huevo, fue utilizada para la detección de anticuerpos maternos contra REV y ha proporcionado una estimación aproximada de la extensa exposición horizontal a REV en los pavos reproductores de una granja. Los pavos expuestos a REV horizontalmente han mostrado mayor cantidad de sueros reactivos cuando fueron evaluados a edades mayores a 12 semanas (Salem et al, 1989).

En 1992, en Israel se inició un programa de erradicación del REV, basado en la prueba de ELISA, mediante la identificación y eliminación de reproductores abuelos infectados. Posteriormente esta prueba se ha extendido hasta en lotes saludables para evaluar el grado de contaminación del ambiente, condenando a un lote como REV positivo si el 50% o más de los sueros resultaban positivos a la prueba (Davidson y Malkinson, 1997).

Se deben evaluar como mínimo 10 a 15 aves por lote, el pool de sueros no es recomendado. Los sueros deben diluirse en 1:200 a 1:400 para evitar reacciones falso

positivas (Witter, 1992). La incidencia de sueros positivos en lotes positivos es de moderada a alta (mas del 25% de sueros positivos del lote). Los resultados de seropositividad a REV por ELISA necesitan ser confirmados por otras pruebas serológicas como el virus neutralización o inmunofluorescencia (Witter 2004, referencia personal).

2.9.3 Diagnóstico Diferencial

El diagnóstico es difícil debido a la variabilidad de las lesiones, ausencia de lesiones características al agente y la similitud con diversas etiologías (Ritchie et al, 1999). El diagnóstico diferencial de los linfomas virales de las aves está basado en criterios patológicos, además de la evidencia virológica y serológica de la infección (Witter,1992; Fadly, 1997). Sin embargo, los virus que causan enfermedad tumoral (VLA, VEM y REV) están muy dispersos y es común tener la infección en la ausencia de formaciones tumorales.

El síndrome del enanismo debe ser diferenciado de la EM en el pollo, en especial cuando existen lesiones nerviosas (Witter, 2000). Las lesiones de los nervios suelen ser menos extensas y pueden contener mas células plasmáticas que las de MD pero en otros casos su diferenciación histopatológica es difícil (Manual Merck, 2000). Ambas lesiones deben diferenciarse también con la neuropatía espontánea (Witter y Fadly, 2003). Las enfermedades inmunodepresoras causados por enfermedad de la bursa de Fabricio, anemia infecciosa, entre otros agentes víricos, deben ser considerados para diferenciarlos de REV (Manual Merck, 2000; Witter, 2000).

Los linfomas crónicos en pollos, de origen bursal, son patológicamente idénticos a los de Leucosis Linfoide (Witter, 1997b), siendo usadas las técnicas basadas en inmunocitoquímica con anticuerpo monoclonal contra antígenos celulares, tumorales y virales (Fadly, 1997; Witter y Fadly, 2003). Además estos tumores deben contener secuencias de ADN proviral del virus respectivo insertado cerca del c-myc, que puede permitir la diferenciación de tumores por hibridización molecular o PCR (Witter, 2000).

Los linfomas crónicos de origen no bursal, cuyo período de latencia es breve a diferencia de la leucosis linfoide (Witter, 2000) se asemejan superficialmente a los de la enfermedad de Marek (Witter, 1997b); siendo insuficientes los criterios patológicos. No se encuentra el antígeno pp38 que a veces se presenta en linfomas de Marek (Witter, 2000), así como carece de los antígenos de superficie CMH de clase II presentes en los linfomas de Marek (Wakenell, 1997; Witter, 2000).

No se requiere diagnóstico diferencial en el síndrome de neoplasia de célula reticular aguda que sólo se ha reproducido experimentalmente en laboratorio (Witter, 2000).

Las infecciones múltiples causados por el sinergismo entre retrovirus y virus de la EM hacen cambiar las características de estas enfermedades, complicando su diagnóstico diferencial (Wakenell, 1997). Las técnicas de inmunocitoquímica e hibridación molecular están siendo usadas para realizar procedimientos específicos para el diagnóstico mas definitivo de linfomas virales aviáres (Fadly, 1997). La técnica de PCR puede proporcionar datos confusos a menos que otros agentes etiológicos sean excluidos (Witter, 1997a).

2.10 Control y prevención

No se han aplicado procedimientos de control en la práctica comercial debido a la naturaleza esporádica y subclínica de las infecciones por REV (Payne, 1998) y debido a que las técnicas y conocimientos necesarios no se encuentran disponibles (Witter, 2000; Witter y Fadly, 2003). Sin embargo se podría erradicar mediante la prevención de la transmisión vertical a través de exámenes de muestras de albúmina de huevo para detección de antígeno del REV (Payne, 1998).

Sería necesario extrapolar los principios de erradicación contra la Leucosis Aviar para el caso de RE (Payne y Venugopal, 2000; Witter, 1997a), mediante la eliminación de reproductoras transmisoras potenciales y la crianza de la progenie bajo condiciones de aislamiento, donde la infección horizontal puede ser evitada (Witter y Fadly, 2003); sin embargo los machos podrían ser los transmisores potenciales y la infección

horizontal puede ser mas difícil de controlar (Witter, 2000) además no hay una fuente comercial de kits de Elisa para detección de antígenos contra REV, prueba con valor potencial para realizar cualquier procedimiento de erradicación (Witter, 1997a). Estos procedimientos de control deben considerarse si en las parvadas de reproductoras de valor el REV se vuelve endémica (Witter, 2000).

El control de REV es necesario para evitar la exposición ambiental (Witter y Fadly, 2003) y la seroconversión de los lotes reproductores cuya progenie se destine a la exportación, sin embargo, se deben aclarar los reservorios naturales de la infección y su forma de introducción (Manual Merck, 2000; Witter y Fadly, 2003), pues aún es un enigma la permanencia de la infección en el reservorio (Witter, 1997a).

Actualmente, las compañías de biológicos en avicultura están practicando métodos para una adecuada identificación de REV en vacunas contaminadas (Davidson y Malkinson, 1997; Witter, 1997a) y el riesgo podría estar reduciéndose (Witter, 1997b). En granjas con lotes SPF, el PCR puede detectar un brote de REV antes que se puedan detectar las respuestas serológicas, previniendo la contaminación de los sustratos para la producción de las vacunas (Davidson y Malkinson, 1997; Taylor et al, 1997). El trabajo de monitoreo por los gobiernos y compañías biológicas ante la contaminación por REV, estaría reduciendo el riesgo de obtener productos contaminados (Witter, 1997b).

La vacunación de los pollos con el virus de la Difteroviruela aviar recombinante proporciona ligera protección contra el síndrome de enanismo causado por REV (Witter, 2000). El uso de partículas con REV defectuoso usando una línea celular canina que permite la transformación denominada D17 también mostró inducir anticuerpos neutralizantes en pollos inoculados (Witter y Fadly, 2003).

El rol de la inserción del genoma del REV en otros virus (Fadly et al, 2004; Payne, 1998), aún desconocido, puede ayudar a proporcionar nuevos métodos con estrategias efectivas en el control de la infección por el REV (Fadly et al, 2004).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE ESTUDIO Y ANIMALES

El estudio se realizó en 28 granjas comerciales de la provincia de Lima y del departamento de La Libertad. Las muestras fueron colectadas durante los meses de julio del 2004 a marzo del 2005. El procesamiento de las muestras fue realizado en el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Los animales muestreados fueron un total de 630 aves, procedentes de 42 lotes de gallinas ponedoras comerciales en producción. Las aves fueron clasificadas de acuerdo a tres variables: antecedentes por problemas tumorales (presencia o ausencia), líneas genéticas (Hy Line, Isa Brown, Lohman y Brown Link), y grupos étnicos.

3.2 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL

El tamaño de la muestra fue determinado considerando el número total de lotes en producción de granjas formales en la provincia de Lima y departamento de La Libertad, obteniéndose mediante la fórmula siguiente para detección de enfermedad en una población:

$$n = \left\lceil 1 - (1 - CL)^{1/d} \right\rceil \cdot \left\lceil N - (d-1)/2 \right\rceil$$

Donde:

n = tamaño de muestra requerido

N = tamaño de la población (187)

d = número esperado de lotes de aves infectadas (7%* del total =13.09)

CL = 95% nivel de confianza

Reemplazando:

$$n = 37$$

Por lo tanto, se tomarán muestras de al menos 37 lotes. Se considerará el número mínimo de 15 aves por lote (Witter,1992).

(*) Debido a que no existen estudios previos en el Perú en lotes de gallinas ponedoras comerciales, se ha fijado arbitrariamente una prevalencia límite de 7 %, y mediante la fórmula utilizada se espera hallar lotes infectados en al menos 7% de la población estudiada.

3.3 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

El muestreo se realizó al azar, obteniéndose las muestras de sangre de las aves a través de la punción en la vena braquial con agujas estériles N° 18 descartables, extrayendo 2 ml de sangre aproximadamente, y colectadas en frascos estériles de vidrio sin anticoagulante, colocados en plano inclinado (aprox. en ángulo de 45 grados) hasta lograr su coagulación. Luego fueron transportados al Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Posteriormente los sueros fueron extraídos, utilizando una pipeta, colocados en viales y conservados en congelación a -20°C, hasta la realización de la prueba diagnóstica.

3.4 TÉCNICA DE LABORATORIO

Los sueros obtenidos fueron procesados con el fin de evaluar la presencia de anticuerpos contra el virus de Reticuloendoteliosis Aviar, para lo cual se utilizó la técnica de ELISA Indirecta mediante el kit comercial IDEXX Lab. El desarrollo de la técnica se encuentra descrito en el Apéndice N° 1.

Kit comercial de ELISA indirecto

El kit comercial REV (Figura N°2) es un inmunoanálisis enzimático de los laboratorios IDEXX diseñado para medir la concentración relativa del anticuerpo contra REV en el suero de los pollos. Cada placa constituida por 96 pocillos es tapizada con antígenos del virus REV y luego de la incubación de la muestra en el pocillo cubierto, se agrega un anticuerpo específico contra el REV, formando un complejo con los antígenos virales. Luego de la eliminación por lavado del material no unido, se añade a los pozos un conjugado que se une a los complejos del anticuerpo de pollo en los pocillos. El conjugado que no logra unirse queda eliminado con el posterior lavado, agregándose luego a los pocillos un sustrato enzimático. El cambio de color resultante está directamente relacionado con la cantidad de anticuerpo anti-REV presentes en la muestra (Figura N°3).

Para que el ensayo sea válido, la diferencia entre la absorbancia promedio para el control positivo y para el control negativo debe ser mayor que 0.075, debiendo ser la absorbancia promedio para el control negativo menor o igual que 0.150. La demostración de la presencia o ausencia de anticuerpos contra REV se obtiene por medio del valor del cociente M/P que determina la relación entre el valor de la absorbancia (filtro de 650nm) de la muestra con el promedio para el control positivo. El control positivo representa concentraciones significativas del anticuerpo anti-REV en el suero de pollo. La concentración relativa del anticuerpo en la muestra se determina a través del cálculo del cociente de la absorbancia de la muestra con respecto a la del control positivo, y finalmente los cálculos en el programa FlockChek computarizado obtienen los títulos finales para la prueba.

Interpretación de resultados

Se consideraron muestras positivas aquellas con cocientes M/P superiores a 0.5 (títulos superiores a 1076) y negativas cuyo cociente M/P fue inferior o igual a dicho valor. El cociente M/P fue hallado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Cociente M/P} = \frac{\text{Resultado de la muestra} - \text{CNx}}{\text{CPx} - \text{CNx}}$$

CNx=Promedio para el control negativo

CPx=Promedio para el control positivo

3.5 ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados generales se expresaron en porcentaje con su respectivo intervalo de confianza al 95%, teniendo en cuenta la positividad de los lotes a la prueba serológica, considerando que un lote es positivo si al menos un suero es positivo a la prueba.

Los resultados fueron ingresados a una base de datos en las que se consideró las variables: antecedentes de problemas tumorales, grupo étnico, líneas genéticas y resultado de la prueba diagnóstica. Estos resultados fueron sometidos a la prueba de Chi cuadrado (Kenneth y Sander,1998), a fin de evaluar la asociación de los lotes reactivos REV y las variables antes mencionadas.

Frecuencia

Una vez determinados el número de lotes positivos, se calculó la frecuencia de infección haciendo uso de la siguiente fórmula:

$$F = \frac{\text{N}^\circ \text{ de lotes positivos}}{n}$$

Donde:

F = Frecuencia

n = Tamaño muestral

Intervalo de confianza

$$IC = F \pm z \sqrt{F(1-F) / n}$$

Donde:

IC = Intervalo de Confianza

F = frecuencia obtenida

$z = 1.96$

n = Tamaño muestral

Fig. 2: Kit comercial de ELISA para detección de anticuerpos contra el virus de la Reticuloendoteliosis (IDEXX)



Fig. 3: Microplaca de la prueba de ELISA Indirecta con muestras seroreactoras de gallinas ponedoras



IV. RESULTADOS

Los resultados de la detección de anticuerpos contra el virus de Reticuloendoteliosis mediante la prueba de ELISA en 630 muestras de suero sanguíneo de 42 lotes en producción, pertenecientes a 28 granjas comerciales de aves ponedoras; considerando que la prevalencia referencial de este estudio fue de 7%, los resultados han mostrado la detección de la infección igual o superior a la prevalencia referencial esperada y se presentan en los cuadros siguientes:

El cuadro 1 presenta la frecuencia de lotes de gallinas ponedoras comerciales seroreactoras al REV, observándose una frecuencia general de 33.33% \pm 14.22% (14/42). Asimismo, las aves procedentes de Lima presentaron frecuencia de 22.22% (6/27); y las que procedieron de La Libertad presentaron frecuencia de 53.33% (8/15).

El cuadro 2 muestra la frecuencia de lotes de gallinas ponedoras comerciales seroreactoras al REV según presentación de problemas tumorales, observándose en las aves con antecedentes tumorales una frecuencia de 38.46% (5/13), y en las aves que no presentaron antecedentes tumorales, se observó una frecuencia de 31.03% (9/29); al aplicar la prueba de Chi cuadrado no se encontró diferencia estadística significativa entre los resultados ($p > 0.05$).

El cuadro 3 muestra la frecuencia de lotes de gallinas ponedoras comerciales seroreactoras al REV según grupo etáreo, observándose en las aves de 20 a 35 semanas

frecuencia de 50% (4/8); en aves de 36 a 50 semanas se ha detectado frecuencia de 40% (4/10); en las aves de 51 a 65 semanas la frecuencia fue de 12.50% (2/16). El último grupo etéreo mayor a 65 semanas presentó una frecuencia de 50% (4/8). En el análisis estadístico no se encontró diferencia estadística significativa ($p>0.05$).

El cuadro 4 presenta la frecuencia de lotes de gallinas ponedoras comerciales seroreactoras al REV según líneas genéticas, observándose en la línea Hy Line 45.45% (10/22). En la línea Isa Brown, se observó frecuencia de 28.57% (2/7). Asimismo, la línea Lohman presentó frecuencia de 9.09% (1/11). La última línea evaluada Brown Link presentó frecuencia de 50% (1/2). La prueba de Chi Cuadrado no mostró diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre las líneas genéticas.

El cuadro 5 presenta el porcentaje de sueros reactivos a REV en lotes seroreactivos de gallinas ponedoras comerciales, presentando de un total de 14 lotes, 5 (36%) lotes con menos del 25 % de sueros reactivos y 9 (64%) lotes con 25% o más sueros positivos.

CUADRO 1. Frecuencia de lotes de gallinas ponedoras comerciales seroreactoras al REV en Lima y La Libertad. Perú (2004-2005).

Procedencia	Lotes	
	N positivos /N examinados	Frecuencia (%)
Lima	6/27	22.22
La Libertad	8/15	53.33
Total	14/42	33.33 (19.11-47.55)*

* IC 95%

CUADRO 2. Frecuencia de lotes de gallinas ponedoras comerciales seroreactoras al REV según antecedentes de problemas por tumores. Lima, La Libertad-Perú (2004-2005).

Problemas tumorales	Lotes	
	N positivos / N examinados	Frecuencia (%)
Positivo	5/13	38.46
Negativo	9/29	31.03
Total	14/42	33.33 ±14.22*

* IC 95%

CUADRO 3. Frecuencia de lotes de gallinas ponedoras comerciales seroreactoras al REV según grupo etáreo. Lima, La Libertad-Perú (2004-2005).

Grupo etáreo (semanas)	Lotes	
	N positivos /N examinados	Frecuencia (%)
20 a 35	4/8	50.00
36 a 50	4/10	40.00
51 a 65	2/16	12.50
Mayor a 65	4/8	50.00
Total	14/42	33.33 ±14.22 *

* IC 95%

CUADRO 4. Frecuencia de lotes de gallinas ponedoras comerciales seroreactoras al REV según líneas genéticas. Lima, La Libertad- Perú (2004-2005).

Líneas genéticas	Lotes	
	N positivos / N examinados	Frecuencia (%)
Hy Line	10/22	45.45
Isa Brown	2/7	28.57
Lohman	1/11	9.09
Brown Link	1/2	50.00
Total	14/42	33.33 ±14.22*

* IC 95%

CUADRO 5. Porcentaje de sueros reactivos a REV en los lotes seroreactivos de gallinas ponedoras comerciales. Lima, La Libertad- Perú (2004-2005).

Sueros reactivos	Numero de lotes seroreactivos	Porcentaje (%)
Menos del 25%	5	36
25% o más	9	64
Total	14	100

V. DISCUSIÓN

Los resultados del estudio realizado con el fin de determinar la presencia del virus de Reticuloendoteliosis Aviar en aves ponedoras comerciales, en 42 lotes de gallinas ponedoras en producción, procedentes de granjas ubicadas en dos zonas geográficas de la costa del Perú, mostraron que existió seroconversión en 14 lotes (33.33%). Se encontró que 6 de los 27 lotes ubicados en la provincia de Lima (22.22%) y, 8 de 15 lotes en el departamento de La Libertad (53.33 %), fueron seroreactores. Los resultados han mostrado una presencia de infección superior al 7%, que fue la prevalencia referencial utilizada. No se encontró diferencias estadísticas significativas entre lotes positivos y las variables: antecedentes tumorales, grupo etéreo, o línea genética. Sin embargo, con estos resultados se evidencia la presencia del virus de REV en aves ponedoras comerciales en las dos zonas, y por ende en el Perú. Es importante señalar que las granjas comerciales que participaron en el estudio están ubicadas en zonas de alta densidad poblacional de aves y se caracterizan por tener la mayor población de gallinas ponedoras en el Perú.

La evaluación serológica en las poblaciones aviares es determinada por lotes; estos pueden estar conformados por 10 mil o 30 mil aves, independientemente de la población de aves en el lote, un número de muestras representativo es remitido al laboratorio para su análisis, esta puede ser mínimo de 15 y máximo de 100. Asimismo, la prueba de ELISA es una prueba tamiz y no es definitiva para diagnóstico de infección en el ave, debido a que no cuenta con 100% de especificidad. Por lo tanto, un suero

positivo a esta prueba evidencia que el lote es sospechoso de infección con el agente y es necesario pruebas de confirmación como virus neutralización o inmunofluorescencia para un diagnóstico definitivo (Witter,2004). Estudios anteriores hechos en otros países para detectar anticuerpos a REV en pavos reproductores también por ELISA, dieron como resultado 91.3% de seroreactores, demostrando que esta prueba es útil en la determinación de exposición horizontal continua (Salem et al,1989).

En el presente estudio, los resultados de la prueba de ELISA por lote se interpretaron como positivo si al menos un suero seroconvirtió. En estos resultados, se han hallado altos porcentajes de aves de postura comercial rectoras dentro de cada lote y los valores de las densidades ópticas de las muestras que dieron positivo fueron mucho mayores comparado a los controles positivos, presentando alta seroconversión, esto indica que las aves que resultaron rectoras a la prueba eran probablemente positivas confirmadas. Un estudio anterior a este realizado por Salas (2005) en nuestro país en lotes de gallinas reproductoras de postura y carne mayores de 50 semanas de edad detectó 3 sueros positivos del total de 180 analizados, sin embargo los valores de densidad óptica de estos sueros tuvieron niveles inferiores a los controles positivos indicando que dichos sueros fueron probablemente reactores falso positivos; concluyendo que las reproductoras en el Perú estarían libres de REV. El virus REV es un agente de transmisión vertical y horizontal, los resultados del estudio hecho por Salas (2005) mitiga la posibilidad de la infección en pollitas ponedoras comerciales, usadas en nuestro estudio, por transmisión vertical al nacimiento. No obstante, se debe tener en cuenta las deficientes medidas de bioseguridad en la crianza de aves de postura comercial comparado con el alto nivel de bioseguridad en granjas de reproductoras. Esto conlleva a un alto riesgo de contaminación durante la crianza en gallinas de postura, haciendo posible los hallazgos de seroconversión detectados en nuestro estudio.

Se hallaron 33.33% (14/42) lotes seropositivos al REV (Cuadro 1). Estos resultados pueden ser comparables a los resultados obtenidos por Witter y colaboradores (1982) en EEUU que evaluó 354 lotes de aves comerciales usando la prueba de inmunofluorescencia indirecta en el que fueron positivos 13.6% de los mismos, y dentro de estos lotes evaluados, obtuvo una alta frecuencia de infección en los lotes de postura, siendo positivos 21% de 101 lotes de ponedoras comerciales y

concluyendo que la infección por REV en aves comerciales es de esporádica a frecuente. Se debe tener en cuenta que en EEUU ya hubieron reportes de la presencia del REV en el medio, por lo tanto la prevalencia de la infección esperada en el estudio antes mencionado ha sido alta, y a diferencia de nuestro estudio, no mencionaron que las aves tuvieran antecedentes de problemas tumorales. Witter y Fadly (2003) señalan que existen otros estudios realizados por Bagust en diferentes países que confirman la presencia de anticuerpos a REV en pollos comerciales y pavos, aunque con frecuencias variables. Asimismo, estudios recientes (1993-1995) documentan la detección de anticuerpos contra REV en hasta 60 a 80% de las aves en ciertas parvadas de EEUU y Japón, indicando que la frecuencia de parvadas seropositivas está aumentando (Witter,2000).

Se sabe que, la neoplasia linfoide crónica y el síndrome del enanismo son las manifestaciones clínicas más comunes que ocasiona la infección por el REV (Whiteman y Bickford, 1996). Asimismo, REV puede producir tumores similares a los de la enfermedad de Marek y a los de Leucosis Aviar siendo un problema para el diagnóstico diferencial. Por todo esto, fue factible establecer la relación entre los problemas tumorales y la infección con el REV, hallando en nuestro estudio 38.46% lotes seroreactores que tuvieron antecedentes de haber padecido problemas tumorales (Cuadro 2). Por tanto, en estos lotes es probable que los problemas tumorales hayan sido causados por REV. Asimismo hubieron 31% lotes seroreactores que no tuvieron antecedentes, que nos indicaría lotes que no han presentado o no presentan aún la forma clínica. A pesar de la diferencia entre los resultados positivos y la presencia de antecedentes tumorales, no se encontró asociación estadística significativa.

Actualmente los signos clínicos de enanismo y neoplasias están asociados principalmente al uso de vacunas contaminadas con REV (Witter, 1997a). Se ha documentado los tumores linfoides crónicos en Australia en una parvada de ponedoras luego de la administración de una vacuna contra la enfermedad de Marek, contaminada con REV, presentando también una alta frecuencia de anticuerpos (Witter et al, 1982) asimismo en EEUU en dos parvadas de reproductoras de carne fueron observados linfomas relacionados con REV por el uso de una vacuna de viruela aviar contaminada con este agente. En contraposición, en el Medio Oriente se han observado linfomas

relacionados con REV no asociados con vacunas contaminadas (Witter, 2000). En nuestro estudio, la fuente de infección se desconoce, sin embargo como se mencionó anteriormente la vía probable ha sido horizontal. Las vacunas contaminados con REV como fuente de infección no deben ser descartadas, principalmente en los lotes con antecedentes tumorales. Debe considerarse también la existencia de reservorios naturales del virus como fuentes de infección (Witter, 1997b), pues, existe mayor frecuencia del REV en zonas templadas o subtropicales debido a que las aves silvestres pueden ser reservorios naturales del virus (Zavala, 2004). Además, no se descarta la importancia de la transmisión por mosquitos (vectores) que fue considerada en un estudio debido a la variación de seroconversión comparada con los cambios estacionales que coincidían con la cantidad poblacional de mosquitos en el área (Witter, 1997b).

En la interpretación de resultados serológicos, la edad de las aves analizadas es un factor importante a considerar debido a que si la infección se produce a edades tempranas los títulos de anticuerpos podrían ser bajos en la prueba y sería necesario la evaluación del mismo lote un mes después. Asimismo, en aves de edades mayores que examinadas serológicamente meses después de la infección, los títulos de anticuerpos podrían estar declinando (Witter 2004, referencia personal). En nuestro estudio los porcentajes encontrados según grupo etéreo (Cuadro 3), mostraron resultados variables, no habiéndose demostrado asociación estadística significativa. En lotes de aves de 20 a 35 semanas se encontró 50% de seroreacción al igual que en las aves mayores de 65 semanas, sin embargo el menor porcentaje de seroreacción (12.5%) fue encontrado en las aves de entre 51 a 65 semanas. Esto demostraría que el lote puede infectarse a diversas edades. Un estudio realizado en pavos infectados demostró que los anticuerpos permanecen con alta frecuencia por un periodo de 40 semanas. No obstante, Witter (2000) también señala que los anticuerpos son inducidos en frecuencias distintas y persisten por periodos variables.

Debido que el virus se transmite verticalmente, fue analizada la relación resultados positivos y línea genética. Se obtuvo seropositividad en las cuatro líneas genéticas de postura comercial comprendidas en el estudio (Cuadro 4), sin encontrarse diferencia estadística significativa, siendo probable que no exista relación de susceptibilidad de líneas genéticas e infección.

En nuestro estudio se han analizado 14 lotes de postura y de éstos, 9 (64%) han seroconvertido, cada uno con 25% o más muestras positivas (Cuadro 5) y con altos valores de seroconversión. Según Witter (2004, referencia personal) el hallazgo de altos títulos de anticuerpos aunado con un moderado a alto porcentaje de sueros positivos en estos lotes o sea con un 25% o más de muestras positivas, confirman la presencia del virus en dichos lotes. En nuestro estudio se utilizaron 15 muestras por lote; Witter (1992) recomienda una muestra mínima de 10 a 15 sueros por lote o grupo y no utilizar pool de sueros. Asimismo, en Israel desde 1993 el control sanitario de ingreso de lotes de pollos importados, se basó en la evaluación por la prueba de ELISA indirecta considerando a un lote como positivo a REV si el 50% o mas de los sueros resultaban positivos a la prueba, sin embargo recomendaron un monitoreo adecuado de las aves mediante esta prueba en conjunción con el PCR para una vigilancia mas estricta en la erradicación de los lotes positivos al virus (Davidson y Malkinson,1997)

La preocupación por la prevalencia de este agente en el medio se ha incrementado debido a que, se ha reportado que gallinas infectadas con ALV ponen 20 huevos menos que aquellas no infectadas, este mismo perfil puede presentarse con lotes infectados por REV; asimismo las neoplasias diagnosticadas como Leucosis Linfoide, pueden haber sido causadas por REV, pues los tumores que causan ambos virus son patológicamente idénticos y los métodos de diagnóstico diferencial no se encuentran disponibles; además existe gran preocupación por asegurar que los productos biológicos se encuentren libres de contaminación por REV (Witter et al, 1982).

El REV posee un rango de hospederos mas amplio que otro virus tumorales aviares y puede infectar o transformar diferentes tipos celulares, siendo además un agente inmunosupresor (Witter y Fadly, 2003), provoca muertes significativas y pérdidas por decomisos en los lotes de pollos infectados (Witter, 2000); y, debido a la evidencia del agente en nuestro país y la creciente prevalencia en otros países, se debe considerar la vigilancia epidemiológica del REV que evite las posibles perdidas económicas a la industria avícola peruana como ha ocurrido en otros países. Supuestamente, los procedimientos para el control del ALV en pollos podrían usarse para REV, esto incluye la eliminación de gallinas potenciales transmisoras para evitar la

transmisión vertical y criar las progenies bajo condiciones aisladas y de bioseguridad para evitar la infección horizontal.

Es necesario que se clarifiquen los aspectos epidemiológicos de la enfermedad y el control el cual sólo debe ser considerado si la infección por REV se vuelve endémica en alguna parvada reproductora de valor. Las pruebas serológicas son utilizadas para confirmar la ausencia del virus en lotes libres de patógenos o lotes que producen progenies para exportación. El monitoreo serológico en Israel desde 1993, en aves importadas de un día de edad mediante ELISA, redujo el número de lotes positivos a REV. Por consiguiente, estos monitoreos permiten evaluar de forma continua y dinámica la situación sanitaria de las parvadas de aves, siendo recomendable utilizarlos en nuestro país como parte de la vigilancia sanitaria oficial.

En el presente estudio podemos concluir que se encontró evidencia serológica de la presencia del virus de REV en ponedoras comerciales y que es necesario realizar pruebas complementarias en los lotes de aves que fueron seropositivos para una confirmación diagnóstica definitiva.

VI. CONCLUSIONES

- Se encontró seroreacción al virus de la Reticuloendoteliosis mediante la prueba de ELISA, en 14 (33.33%) de los 42 lotes de aves de postura comercial comprendidos en el estudio, demostrando que estos lotes fueron expuestos al virus; 6 lotes se encuentran ubicados en la provincia de Lima y 8 en el departamento de La Libertad. Los resultados indican la presencia del virus en al menos 7% de los lotes de la población estudiada.
- No se encontró asociación estadística significativa entre lotes positivos y antecedentes tumorales, grupo étnico y línea genética.

VII. RECOMENDACIONES

- Al haberse demostrado indirectamente la presencia del virus en el Perú, se recomienda considerar a la Reticuloendoteliosis aviar como parte del diagnóstico diferencial ante cualquier neoplasia en gallinas ponedoras en nuestro medio.
- Evaluar mediante estudios serológicos la presencia del virus de Reticuloendoteliosis aviar en diferentes zonas geográficas del Perú, incluyendo no solo gallinas ponedoras sino otras crianzas industriales de aves en el país.
- Realizar pruebas complementarias, para confirmar definitivamente el diagnóstico serológico.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Calvert, J. y K. Nazerian. 1994.** An Immunoperoxidase Plaque Assay for Reticuloendotheliosis Virus and Its Application to a Sensitive Serum Neutralization Assay. *Avi Dis.*38(1): 165-170
2. **Davidson, I. y M. Malkinson. 1997.** Epidemiology and control of Reticuloendotheliosis Virus in chickens and turkeys in Israel. En: Avian Tumor Viruses Symposium. AAAP. 40th Annual Meeting. Reno Nevada. July 21th, p.70-75.
3. **Fadly, A. 1997.** Criteria for the differential diagnosis of viral lymphomas of chickens: a review. En: Avian Tumor Viruses Symposium. AAAP. 40th Annual Meeting. Reno Nevada. July 21th, p. 6-9.
4. **Fadly, A. y R. Witter. 1983.** Studies of Reticuloendotheliosis Virus- Induced Lymphomagenesis in chickens. *Avi Dis.* 27 (1): 271– 281.
5. **Fadly, A.; R. Witter; R. Crespo; I. Davidson y H. Hafez. 2004.** Retroviruses and Marek's Disease Virus. En: Emerging and Re-emerging Diseases. Symposium Sponsored by the AAAP. 47th Annual Meeting AAAP/AVMA Pennsylvania. July 25 th. p. 33-35.

6. **IDEXX Laboratories. 2000.** Information by Flock Check Reticuloendotheliosis Virus Antibody Test Kit. EEUU.
7. **Jordan, F. 1990.** Reticuloendotheliosis. En: Poultry Diseases 3rd ed. Ed. Baillere Tindall. p.118-120
8. **Kenneth, K. y C. Sander. 1998.** Modern Epidemiology. 2da Ed. p:359-401. Lippincott-Ravon Publishers. EEUU
9. **Madigan, M; J. Martinko y J. Parker. 2001.** Biología de los microorganismos. 8va. Ed., p. 295-298. Ed. Prentice Hall. España..
10. **Marie, P. y S. Comte. 2000.** Vaccines and Vaccination in poultry Production. s/p En: Laboratory Analyses and their uses. Cap. IV. Biological Bussiness Unit. EEUU.
11. **McDougall, J; R. Shilleto y P. Brigg. 1980.** Experimental infection and vertical transmission of reticuloendotheliosis virus in the turkey. Avian Pathology. 9:445-454.
12. **McDougall, J; R. Shilleto y P. Brigg. 1981.** Further studies of vertical transmission of reticuloendotheliosis virus in turkeys. Avian Pathology. 10:163-169.
13. **Medina, A. y Y. Ghazikhanian. 1997.** Reticuloendotheliosis Virus infection in turkeys: Industry perspective. En: Avian Tumor Viruses Symposium. AAAP. 40th Annual Meeting. Reno Nevada. July 21th, p.67-68.
14. **Merck & Co. Inc. 2000.** El Manual Merck de Veterinaria. 5ta. Ed. Ed. OCEANO/CENTRUM. Barcelona- España. p:2180-2182
15. **Moore, K.; J. Davis; T. Sato y A. Yasuda 2000.** Reticuloendotheliosis Virus (REV) Terminal Repeats Incorporated in the genomes of commercial Fowl

Poxvirus Vaccines and Pigeon Poxviruses Without Indication of the Presence of Infectious REV. *Avian Disease*. 44 (4): 827-839.

16. **Motha, M. y J. Egerton. 1987.** Vertical transmission of reticuloendotheliosis virus in chickens. *Avian Pathology*. 16:141-148.
17. **Motha, M.; J. Egerton y W. Sweeney. 1983.** Some Evidence of Mechanical Transmission of reticuloendotheliosis Virus by Mosquitoes. *Avian Disease*. 28 (4): 858-866.
18. **Murray, P.; G. Kobayashi; M. Pfaller; K. Rosenthal. 1999.** Microbiología Medica. Segunda Edición. Ed. Harcourt Brace. España. p 684-688.
19. **Payne, L. 1998.** Retrovirus- Induced Diseases in Poultry. Symposium: Infectious Poultry Diseases. *Poultry Science*. 77(8):1204-1210.
20. **Payne, L. y K. Venugopal. 2000.** Enfermedades neoplásicas: enfermedad de Marek, Leucosis Aviar y Reticuloendoteliosis Aviar. *Rev. Sci. Tech.OIE*. 19(2):544-564. Disponible en:

http://www.oie.int/esp/publicat/rt/1902/e_r19213.htm
21. **Purchase, H. y R. Witter. 1975.** The Reticuloendotheliosis viruses. Current topics in microbiology and immunology. EEUU. p.103-124.
22. **Ritchie, B.; W. Branson y G. Harrison. 1999.** Retroviridae. En :*Avian Medicine Principles and Application*. Chapter 32. HBD Internacional Inc. p.931-936.
23. **Salas, E. 2005.** Evidencia serológica contra el virus de Reticuloendoteliosis Aviar en gallinas reproductoras mayores de 50 semanas de edad mediante la prueba de Elisa. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria. UNMSM. Lima. 50p.

24. **Salem, M.; J. Eckroade y L. Keller. 1989.** Experiences using Elisa in a Reticuloendotheliosis outbreak in turkeys. En: Proceedings of the thirty-eight western poultry disease conference. March 6-9, Arizona, p. 174-175.

25. **Smith, E. y R. Witter. 1983.** Detection of antibodies against Reticuloendotheliosis Viruses by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Avi Dis.* 27 (1): 225-233.

26. **Taylor, S.; R. Hyde y T. Myers. 1997** Methods for detection of Reticuloendotheliosis Virus contamination in poultry vaccines. En: Avian Tumor Viruses Symposium. AAAP. 40th Annual Meeting. Reno Nevada. July 21th, p.76-78.

27. **Wakenell, P. 1997 .** An overview of problems in diagnosis of neoplastic diseases of poultry. En: Avian Tumor Viruses Symposium. AAAP. 40th Annual Meeting. Reno Nevada. July 21th, p. 1-3.

28. **Whiteman, Ch. Y S. Bickford. 1996.** Avian Diseases Manual. 4th. Ed. American Association of Avian Pathologists. Univ. Pensylvania. p. 26-28

29. **Witter, R. 1992.** Reticuloendotheliosis. En: A Laboratory Manual for the isolation and identification of Avian Pathogeny. 3rd Ed/AAAP. Kendall/Hunt Publishing Company. p.143-148

30. **Witter, R. 1997a.** Reticuloendotheliosis Virus: An overview of current issues. En: Avian Tumor Viruses Symposium. AAAP. 40th Annual Meeting. Reno Nevada. July 21th, p.63-64.

31. **Witter, R. 1997b.** Avian Tumor Viruses: Persistent Evolving Pathogens. *Acta Veterinaria Hungarica.* Hungría. 45(3):251-266.

32. **Witter, R. 2000.** Reticuloendotheliosis. En: Diseases of Poultry. 2^a ed. en español. Cap.17. B. W. Calnek; H.J Barnes Saif (Eds). Iowa State University Press. Ames, I.A. p.478 -496.
33. **Witter, R. 2004.** witerr@msu.edu. Referencia personal.
34. **Witter, R y A. Fadly. 2003.** Reticuloendotheliosis. En: Diseases of Poultry. 11th Ed. Cap.15 Edit by Saif, Barnes, Glisson, Fadly, Mc Dougald, Swayne. Ed. AAAP Iowa State University Press. EEUU. p 517 – 529.
35. **Witter, R. y D. Salter. 1989.** Vertical transmission of reticuloendotheliosis virus in breeder turkeys. *Avian Diseases*.33:226-235.
36. **Witter, R.; I. Peterson; E. Smith y D. Johnson. 1982.** Serologic evidence in commercial chicken and turkey flocks of infection with Reticuloendotheliosis Virus. *Avi Dis.* 26 (4): 753 – 762.
37. **Zavala, G.2004.** Enfermedades tumorales en aves. Charla en curso Segunda Especialización en Aves. 27 marzo, 2004. Facultad de Medicina Veterinaria. UNMSM. Lima, Perú.
38. **Zavala, G.2005.** gzavala@uga.edu. Referencia personal

APÉNDICE 1 .

Desarrollo de la técnica de ELISA indirecta

Los reactivos fueron expuestos a temperatura ambiente y agitados por inversión con un movimiento circular. Las muestras fueron diluidas 1:500 con el diluyente de las muestras, siendo luego bien mezcladas antes de iniciar el desarrollo de la técnica. El procedimiento fue el siguiente (IDEXX Laboratorios, 2000):

- Se obtuvo las placas recubiertas con antígeno y se anotó la posición de las muestras en una hoja de trabajo FlockCheck.
- Fueron vertidos 100 μ l de control negativo no diluido en los pozos A1 y A2. Del mismo modo fueron vertidos 100 μ l de control positivo no diluido en los pozos A3 y A4.
- Se vertieron 100 μ l de muestra diluida en los pozos correspondientes, procediéndose a incubar el total de muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Pasado este tiempo se lavó cada pozo de tres a cinco veces con unos 350 μ l de agua destilada.
- Se vertió 100 μ l de conjugado en cada pozo incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se repitió el cuarto paso.
- Posteriormente se vertió 100 μ l de la solución sustrato en cada pozo, incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Fueron vertidos 100 μ l de la solución de paro en cada pozo, calibrando el lector en blanco con aire.
- Se procedió a la lectura con filtro de 650 nm en el lector de Elisa.



APÉNDICE 2.

Identificación de los 42 lotes de gallinas ponedoras comerciales con los resultados obtenidos por lote mediante la prueba de ELISA Indirecta

Lote	Gja	Procedenc	Edad	Línea	Probl. Tumor	NªSueros procesad	Nº sueros positivo	Resultado por lote
1	G1	Lima	67 semanas	Lohman	Si	15	0	Negativo
L2			61 semanas	Isa Brown	Si	15	0	Negativo
L3	G2	Lima	29 semanas	Lohman	Si	15	0	Negativo
L4			39 semanas	Lohman	Si	15	0	Negativo
L5	G3	Lima	30 semanas	Lohman	No	15	0	Negativo
L6	G4	Lima	60 semanas	Lohman	No	15	0	Negativo
L7	G5	Lima	60 semanas	Hy Line	Si	15	0	Negativo
L8	G6	Lima	69 semanas	Hy Line	No	15	0	Negativo
L9	G7	Lima	41 semanas	Isa Brown	Si	15	0	Negativo
L10			65 semanas	Isa Brown	No	15	0	Negativo
L11	G8	Lima	65 semanas	Hy Line	No	15	0	Negativo
L12			63 semanas	Hy Line	No	15	0	Negativo
L13	G9	Lima	67 semanas	Hy Line	No	15	0	Negativo
L14	G10	Lima	69 semanas	Hy Line	No	15	0	Negativo
L15			63 semanas	Lohman	No	15	0	Negativo
L16	G11	Lima	29 semanas	Lohman	No	15	0	Negativo
L17	G12	Lima	27 semanas	Lohman	No	15	1	Positivo
L18	G13	Lima	28 semanas	Hy Line	No	15	1	Positivo
L19			20 semanas	Hy Line	No	15	15	Positivo
L20	G14	Lima	62 semanas	Hy Line	No	15	0	Negativo
L21	G15	Lima	57 semanas	Hy Line	No	15	3	Positivo
L22			57 semanas	Hy Line	No	15	0	Negativo
L23	G16	Lima	47 semanas	Hy Line	No	15	2	Positivo
L24			30 semanas	Hy Line	Si	15	7	Positivo
L25	G17	Lima	58 semanas	Isa Brown	No	15	0	Negativo
L26			60 semanas	Hy Line	No	15	0	Negativo
L27	G18	Lima	65 semanas	Lohman	No	15	0	Negativo
L28	G19	La Libertad	36 semanas	Hy Line	Si	15	15	Positivo

L29	G20	La Libertad	41 semanas	Lohman	Si	15	0	Negativo
L30	G21	La Libertad	39 semanas	Isa Brown	Si	15	0	Negativo
L31	G22	La Libertad	54 semanas	Isa Brown	Si	15	15	Positivo
L32	G23	La Libertad	43 semanas	Hy Line	Si	15	15	Positivo
L33	G24	La Libertad	70 semanas	Hy Line	Si	15	11	Positivo
L34			38 semanas	Hy Line	No	15	0	Negativo
L35	G25	La Libertad	68 semanas	Hy Line	No	15	5	Positivo
L36			66 semanas	Hy Line	No	15	10	Positivo
L37	G26	La Libertad	22 semanas	Hy Line	No	15	0	Negativo
L38	G27	La Libertad	70 semanas	Brownlink	No	15	5	Positivo
L39			40 semanas	Brownlink	No	15	0	Negativo
L40	G28	La Libertad	53 semanas	Hy Line	No	15	0	Negativo
L41			47 semanas	Isa Brown	No	15	3	Positivo
L42			57 semanas	Lohman	No	15	0	Negativo

**APÉNDICE 3. Valores de densidad óptica obtenidos por cada muestra de los lotes
evaluados mediante la prueba de ELISA Indirecta**

MUESTRAS	D.O.	S/P	TÍTULO	GRUPO	RESULTADO
Control Neg	0.078				
Control Neg	0.077				
Control Pos	0.354				
Control Pos	0.376				
LOTE-1	0.116	0.132	252	0	Neg
LOTE-1	0.086	0.031	52	0	Neg
LOTE-1	0.094	0.056	99	0	Neg
LOTE-1	0.094	0.056	99	0	Neg
LOTE-1	0.106	0.097	180	0	Neg
LOTE-1	0.105	0.094	174	0	Neg
LOTE-1	0.091	0.045	78	0	Neg
LOTE-1	0.098	0.069	124	0	Neg
LOTE-1	0.089	0.042	72	0	Neg
LOTE-1	0.118	0.142	273	0	Neg
LOTE-1	0.109	0.108	203	0	Neg
LOTE-1	0.097	0.069	124	0	Neg
LOTE-1	0.106	0.097	180	0	Neg
LOTE-1	0.108	0.108	203	0	Neg
LOTE-1	0.115	0.132	252	0	Neg
LOTE-2	0.138	0.208	414	0	Neg
LOTE-2	0.116	0.132	252	0	Neg
LOTE-2	0.094	0.056	99	0	Neg
LOTE-2	0.087	0.031	52	0	Neg
LOTE-2	0.093	0.056	99	0	Neg
LOTE-2	0.118	0.142	273	0	Neg
LOTE-2	0.116	0.132	252	0	Neg
LOTE-2	0.098	0.069	124	0	Neg
LOTE-2	0.102	0.083	152	0	Neg
LOTE-2	0.106	0.097	180	0	Neg
LOTE-2	0.094	0.056	99	0	Neg
LOTE-2	0.089	0.042	72	0	Neg
LOTE-2	0.108	0.108	203	0	Neg
LOTE-2	0.096	0.066	118	0	Neg
LOTE-2	0.098	0.069	124	0	Neg
LOTE-3	0.109	0.108	203	0	Neg
LOTE-3	0.097	0.069	124	0	Neg
LOTE-3	0.086	0.031	52	0	Neg
LOTE-3	0.109	0.108	203	0	Neg
LOTE-3	0.113	0.122	231	0	Neg
LOTE-3	0.119	0.146	281	0	Neg
LOTE-3	0.140	0.215	429	0	Neg
LOTE-3	0.093	0.056	99	0	Neg
LOTE-3	0.091	0.045	78	0	Neg
LOTE-3	0.112	0.122	231	0	Neg
LOTE-3	0.134	0.198	392	0	Neg
LOTE-3	0.093	0.056	99	0	Neg
LOTE-3	0.122	0.156	302	0	Neg
LOTE-3	0.085	0.028	46	0	Neg
LOTE-3	0.106	0.097	180	0	Neg

LOTE-4	0.119	0.146	281	0	Neg
LOTE-4	0.112	0.122	231	0	Neg
LOTE-4	0.102	0.083	152	0	Neg
LOTE-4	0.082	0.017	27	0	Neg
LOTE-4	0.096	0.066	118	0	Neg
LOTE-4	0.093	0.056	99	0	Neg
LOTE-4	0.109	0.108	203	0	Neg
LOTE-4	0.122	0.156	302	0	Neg
LOTE-4	0.104	0.094	174	0	Neg
LOTE-4	0.095	0.059	105	0	Neg
LOTE-4	0.089	0.042	72	0	Neg
LOTE-4	0.098	0.069	124	0	Neg
LOTE-4	0.107	0.104	194	0	Neg
LOTE-4	0.111	0.118	223	0	Neg
LOTE-4	0.080	0.007	10	0	Neg
LOTE-5	0.120	0.146	281	0	Neg
LOTE-5	0.111	0.118	223	0	Neg
LOTE-5	0.094	0.056	99	0	Neg
LOTE-5	0.092	0.049	86	0	Neg
LOTE-5	0.113	0.122	231	0	Neg
LOTE-5	0.116	0.132	252	0	Neg
LOTE-5	0.090	0.045	78	0	Neg
LOTE-5	0.088	0.035	59	0	Neg
LOTE-5	0.119	0.146	281	0	Neg
LOTE-5	0.093	0.056	99	0	Neg
LOTE-5	0.126	0.170	332	0	Neg
LOTE-5	0.121	0.149	288	0	Neg
LOTE-5	0.107	0.104	194	0	Neg
LOTE-5	0.098	0.069	124	0	Neg
LOTE-5	0.124	0.160	311	0	Neg
LOTE-6	0.122	0.156	302	0	Neg
LOTE-6	0.114	0.125	237	0	Neg
LOTE-6	0.110	0.111	209	0	Neg
LOTE-6	0.094	0.056	99	0	Neg
LOTE-6	0.108	0.108	203	0	Neg
LOTE-6	0.116	0.132	252	0	Neg
LOTE-6	0.095	0.059	105	0	Neg
LOTE-6	0.084	0.021	34	0	Neg
LOTE-6	0.084	0.021	34	0	Neg
LOTE-6	0.109	0.108	203	0	Neg
LOTE-6	0.124	0.160	311	0	Neg
LOTE-6	0.146	0.236	475	0	Neg
LOTE-6	0.100	0.080	146	0	Neg
LOTE-6	0.125	0.163	317	0	Neg
LOTE-6	0.119	0.146	281	0	Neg

LOTE-7	0.087	0.031	52	0	Neg
LOTE-7	0.096	0.066	118	0	Neg
LOTE-7	0.141	0.222	444	0	Neg
LOTE-7	0.109	0.108	203	0	Neg
LOTE-7	0.098	0.069	124	0	Neg
LOTE-7	0.096	0.066	118	0	Neg
LOTE-7	0.107	0.104	194	0	Neg
LOTE-7	0.116	0.132	252	0	Neg
LOTE-7	0.096	0.066	118	0	Neg
LOTE-7	0.098	0.069	124	0	Neg
LOTE-7	0.108	0.108	203	0	Neg
LOTE-7	0.107	0.104	194	0	Neg
LOTE-7	0.103	0.087	160	0	Neg
LOTE-7	0.108	0.108	203	0	Neg
LOTE-7	0.096	0.066	118	0	Neg
LOTE-8	0.106	0.097	180	0	Neg
LOTE-8	0.120	0.146	281	0	Neg
LOTE-8	0.096	0.066	118	0	Neg
LOTE-8	0.089	0.042	72	0	Neg
LOTE-8	0.108	0.108	203	0	Neg
LOTE-8	0.082	0.017	27	0	Neg
LOTE-8	0.085	0.028	46	0	Neg
LOTE-8	0.089	0.042	72	0	Neg
LOTE-8	0.111	0.118	223	0	Neg
LOTE-8	0.093	0.056	99	0	Neg
LOTE-8	0.097	0.069	124	0	Neg
LOTE-8	0.095	0.059	105	0	Neg
LOTE-8	0.094	0.056	99	0	Neg
LOTE-8	0.096	0.066	118	0	Neg
LOTE-8	0.089	0.042	72	0	Neg
LOTE-9	0.094	0.056	99	0	Neg
LOTE-9	0.096	0.066	118	0	Neg
LOTE-9	0.112	0.122	231	0	Neg
LOTE-9	0.118	0.142	273	0	Neg
LOTE-9	0.116	0.132	252	0	Neg
LOTE-9	0.109	0.108	203	0	Neg
LOTE-9	0.104	0.094	174	0	Neg
LOTE-9	0.107	0.104	194	0	Neg
LOTE-9	0.138	0.208	414	0	Neg
LOTE-9	0.129	0.177	347	0	Neg
LOTE-9	0.109	0.108	203	0	Neg
LOTE-9	0.102	0.083	152	0	Neg
LOTE-9	0.094	0.056	99	0	Neg
LOTE-9	0.097	0.069	124	0	Neg
LOTE-9	0.094	0.056	99	0	Neg

LOTE-10	0.108	0.108	203	0	Neg
LOTE-10	0.106	0.097	180	0	Neg
LOTE-10	0.119	0.146	281	0	Neg
LOTE-10	0.116	0.132	252	0	Neg
LOTE-10	0.103	0.087	160	0	Neg
LOTE-10	0.097	0.069	124	0	Neg
LOTE-10	0.095	0.059	105	0	Neg
LOTE-10	0.098	0.069	124	0	Neg
LOTE-10	0.086	0.031	52	0	Neg
LOTE-10	0.108	0.108	203	0	Neg
LOTE-10	0.107	0.104	194	0	Neg
LOTE-10	0.119	0.146	281	0	Neg
LOTE-10	0.088	0.035	59	0	Neg
LOTE-10	0.089	0.042	72	0	Neg
LOTE-10	0.109	0.108	203	0	Neg
LOTE-11	0.088	0.035	59	0	Neg
LOTE-11	0.082	0.017	27	0	Neg
LOTE-11	0.096	0.066	118	0	Neg
LOTE-11	0.085	0.028	46	0	Neg
LOTE-11	0.084	0.021	34	0	Neg
LOTE-11	0.083	0.017	27	0	Neg
LOTE-11	0.099	0.073	132	0	Neg
LOTE-11	0.102	0.083	152	0	Neg
LOTE-11	0.116	0.132	252	0	Neg
LOTE-11	0.085	0.028	46	0	Neg
LOTE-11	0.106	0.097	180	0	Neg
LOTE-11	0.107	0.104	194	0	Neg
LOTE-11	0.084	0.021	34	0	Neg
LOTE-11	0.097	0.069	124	0	Neg
LOTE-11	0.104	0.094	174	0	Neg
LOTE-12	0.097	0.069	124	0	Neg
LOTE-12	0.094	0.056	99	0	Neg
LOTE-12	0.084	0.021	34	0	Neg
LOTE-12	0.093	0.056	99	0	Neg
LOTE-12	0.108	0.108	203	0	Neg
LOTE-12	0.103	0.087	160	0	Neg
LOTE-12	0.084	0.021	34	0	Neg
LOTE-12	0.090	0.045	78	0	Neg
LOTE-12	0.089	0.042	72	0	Neg
LOTE-12	0.082	0.017	27	0	Neg
LOTE-12	0.087	0.031	52	0	Neg
LOTE-12	0.096	0.066	118	0	Neg
LOTE-12	0.097	0.069	124	0	Neg
LOTE-12	0.089	0.042	72	0	Neg
LOTE-12	0.087	0.031	52	0	Neg

LOTE-13	0.108	0.108	203	0	Neg
LOTE-13	0.094	0.056	99	0	Neg
LOTE-13	0.135	0.201	399	0	Neg
LOTE-13	0.120	0.146	281	0	Neg
LOTE-13	0.087	0.031	52	0	Neg
LOTE-13	0.098	0.069	124	0	Neg
LOTE-13	0.109	0.108	203	0	Neg
LOTE-13	0.116	0.132	252	0	Neg
LOTE-13	0.119	0.146	281	0	Neg
LOTE-13	0.087	0.031	52	0	Neg
LOTE-13	0.103	0.087	160	0	Neg
LOTE-13	0.116	0.132	252	0	Neg
LOTE-13	0.104	0.094	174	0	Neg
LOTE-13	0.100	0.080	146	0	Neg
LOTE-13	0.081	0.010	15	0	Neg
LOTE-14	0.094	0.056	99	0	Neg
LOTE-14	0.087	0.031	52	0	Neg
LOTE-14	0.092	0.049	86	0	Neg
LOTE-14	0.091	0.045	78	0	Neg
LOTE-14	0.118	0.142	273	0	Neg
LOTE-14	0.104	0.094	174	0	Neg
LOTE-14	0.103	0.087	160	0	Neg
LOTE-14	0.085	0.028	46	0	Neg
LOTE-14	0.090	0.045	78	0	Neg
LOTE-14	0.081	0.010	15	0	Neg
LOTE-14	0.098	0.069	124	0	Neg
LOTE-14	0.096	0.066	118	0	Neg
LOTE-14	0.107	0.104	194	0	Neg
LOTE-14	0.104	0.094	174	0	Neg
LOTE-14	0.121	0.149	288	0	Neg
LOTE-15	0.114	0.125	237	0	Neg
LOTE-15	0.128	0.177	347	0	Neg
LOTE-15	0.120	0.146	281	0	Neg
LOTE-15	0.098	0.069	124	0	Neg
LOTE-15	0.097	0.069	124	0	Neg
LOTE-15	0.095	0.059	105	0	Neg
LOTE-15	0.094	0.056	99	0	Neg
LOTE-15	0.082	0.017	27	0	Neg
LOTE-15	0.089	0.042	72	0	Neg
LOTE-15	0.107	0.104	194	0	Neg
LOTE-15	0.086	0.031	52	0	Neg
LOTE-15	0.109	0.108	203	0	Neg
LOTE-15	0.106	0.097	180	0	Neg
LOTE-15	0.105	0.094	174	0	Neg
LOTE-15	0.117	0.135	258	0	Neg

LOTE-16	0.120	0.146	281	0	Neg
LOTE-16	0.126	0.170	332	0	Neg
LOTE-16	0.117	0.135	258	0	Neg
LOTE-16	0.102	0.083	152	0	Neg
LOTE-16	0.098	0.069	124	0	Neg
LOTE-16	0.108	0.108	203	0	Neg
LOTE-16	0.086	0.031	52	0	Neg
LOTE-16	0.089	0.042	72	0	Neg
LOTE-16	0.098	0.069	124	0	Neg
LOTE-16	0.106	0.097	180	0	Neg
LOTE-16	0.115	0.132	252	0	Neg
LOTE-16	0.119	0.146	281	0	Neg
LOTE-16	0.107	0.104	194	0	Neg
LOTE-16	0.099	0.073	132	0	Neg
LOTE-16	0.106	0.097	180	0	Neg
LOTE-17	0.340	0.910	2067	0	Neg
LOTE-17	0.163	0.299	614	0	Neg
LOTE-17	0.124	0.160	311	0	Neg
LOTE-17	0.124	0.160	311	0	Neg
LOTE-17	0.106	0.097	180	0	Neg
LOTE-17	0.112	0.122	231	0	Neg
LOTE-17	0.098	0.069	124	0	Neg
LOTE-17	0.111	0.118	223	0	Neg
LOTE-17	0.097	0.069	124	0	Neg
LOTE-17	0.120	0.146	281	0	Neg
LOTE-17	0.118	0.142	273	0	Neg
LOTE-17	0.109	0.108	203	0	Neg
LOTE-17	0.116	0.132	252	0	Neg
LOTE-17	0.123	0.160	311	0	Neg
LOTE-17	0.125	0.163	317	0	Neg
LOTE-18	0.092	0.049	86	0	Neg
LOTE-18	0.093	0.056	99	0	Neg
LOTE-18	0.088	0.035	59	0	Neg
LOTE-18	0.094	0.056	99	0	Neg
LOTE-18	0.097	0.069	124	0	Neg
LOTE-18	0.084	0.021	34	0	Neg
LOTE-18	0.498	1.458	3455	0	Neg
LOTE-18	0.084	0.021	34	0	Neg
LOTE-18	0.089	0.042	72	0	Neg
LOTE-18	0.093	0.056	99	0	Neg
LOTE-18	0.098	0.069	124	0	Neg
LOTE-18	0.088	0.035	59	0	Neg
LOTE-18	0.096	0.066	118	0	Neg
LOTE-18	0.094	0.056	99	0	Neg
LOTE-18	0.177	0.347	723	0	Neg

LOTE-19	1.312	4.288	11198	9	Pos!
LOTE-19	1.150	3.722	9597	8	Pos!
LOTE-19	1.451	4.767	12569	10	Pos!
LOTE-19	1.442	4.740	12491	10	Pos!
LOTE-19	1.191	3.865	10000	9	Pos!
LOTE-19	0.877	2.774	6966	7	Pos!
LOTE-19	1.111	3.587	9218	8	Pos!
LOTE-19	0.771	2.410	5976	6	Pos!
LOTE-19	1.142	3.694	9519	8	Pos!
LOTE-19	1.245	4.056	10540	9	Pos!
LOTE-19	1.365	4.472	11723	9	Pos!
LOTE-19	1.450	4.767	12569	10	Pos!
LOTE-19	1.159	3.757	9696	8	Pos!
LOTE-19	1.249	4.066	10568	9	Pos!
LOTE-19	0.981	3.139	7971	7	Pos!
LOTE-20	0.116	0.132	2527	0	Neg
LOTE-20	0.140	0.215	429	0	Neg
LOTE-20	0.136	0.205	407	0	Neg
LOTE-20	0.090	0.045	78	0	Neg
LOTE-20	0.089	0.042	72	0	Neg
LOTE-20	0.119	0.146	281	0	Neg
LOTE-20	0.098	0.069	124	0	Neg
LOTE-20	0.151	0.253	512	0	Neg
LOTE-20	0.099	0.073	132	0	Neg
LOTE-20	0.098	0.069	124	0	Neg
LOTE-20	0.123	0.160	311	0	Neg
LOTE-20	0.158	0.281	574	0	Neg
LOTE-20	0.106	0.097	180	0	Neg
LOTE-20	0.099	0.073	132	0	Neg
LOTE-20	0.144	0.229	459	0	Neg
LOTE-21	0.783	2.451	6087	7	Pos!
LOTE-21	0.122	0.156	302	0	Neg
LOTE-21	0.079	0.007	10	0	Neg
LOTE-21	1.297	4.236	11050	9	Pos!
LOTE-21	0.862	2.726	6835	7	Pos!
LOTE-21	0.158	0.281	574	0	Neg
LOTE-21	0.094	0.056	99	0	Neg
LOTE-21	0.088	0.035	59	0	Neg
LOTE-21	0.085	0.028	46	0	Neg
LOTE-21	0.079	0.007	10	0	Neg
LOTE-21	0.085	0.028	46	0	Neg
LOTE-21	0.113	0.122	231	0	Neg
LOTE-21	0.118	0.142	273	0	Neg
LOTE-21	0.096	0.066	118	0	Neg
LOTE-21	0.121	0.149	288	0	Neg

LOTE-22	0.078	0.003	4	0	Neg
LOTE-22	0.091	0.045	78	0	Neg
LOTE-22	0.088	0.035	59	0	Neg
LOTE-22	0.122	0.156	302	0	Neg
LOTE-22	0.089	0.042	72	0	Neg
LOTE-22	0.089	0.042	72	0	Neg
LOTE-22	0.112	0.122	231	0	Neg
LOTE-22	0.100	0.080	146	0	Neg
LOTE-22	0.184	0.368	771	0	Neg
LOTE-22	0.081	0.010	15	0	Neg
LOTE-22	0.116	0.132	252	0	Neg
LOTE-22	0.094	0.056	99	0	Neg
LOTE-22	0.098	0.069	124	0	Neg
LOTE-22	0.111	0.111	209	0	Neg
LOTE-22	0.108	0.108	203	0	Neg
LOTE-23	0.141	0.222	444	0	Neg
LOTE-23	0.159	0.281	574	0	Neg
LOTE-23	0.816	2.562	6388	7	Neg
LOTE-23	0.103	0.087	160	0	Neg
LOTE-23	0.091	0.045	78	0	Neg
LOTE-23	0.084	0.021	34	0	Neg
LOTE-23	1.153	3.736	9637	8	Neg
LOTE-23	0.100	0.080	146	0	Neg
LOTE-23	0.093	0.056	99	0	Neg
LOTE-23	0.105	0.094	174	0	Neg
LOTE-23	0.126	0.170	332	0	Neg
LOTE-23	0.102	0.083	152	0	Neg
LOTE-23	0.098	0.069	124	0	Neg
LOTE-23	0.094	0.056	99	0	Neg
LOTE-23	0.107	0.104	194	0	Neg
MUESTRAS	D.O.	S/P	TÍTULO	GRUPO	RESULTADO
Control Neg	0.065				
Control Neg	0.068				
Control Pos	0.229				
Control Pos	0.223				
LOTE-24	0.757	4.319	11287	7	Pos!
LOTE-24	0.464	2.481	6168	0	Neg
LOTE-24	0.338	1.694	4069	0	Neg
LOTE-24	1.245	7.369	20206	9	Pos!
LOTE-24	0.095	0.175	343	7	Pos!
LOTE-24	0.098	0.194	383	0	Neg
LOTE-24	0.090	0.150	290	0	Neg
LOTE-24	0.807	4.625	12161	0	Neg
LOTE-24	0.691	3.900	10099	0	Neg
LOTE-24	0.149	0.519	1121	0	Neg
LOTE-24	0.084	0.106	198	0	Neg
LOTE-24	0.094	0.169	330	0	Neg
LOTE-24	0.086	0.125	237	0	Neg
LOTE-24	0.096	0.188	371	0	Neg
LOTE-24	0.087	0.125	237	0	Neg

LOTE-25	0.083	0.100	186	0	Neg
LOTE-25	0.087	0.125	237	0	Neg
LOTE-25	0.081	0.088	162	0	Neg
LOTE-25	0.076	0.056	99	0	Neg
LOTE-25	0.081	0.088	162	0	Neg
LOTE-25	0.084	0.106	198	0	Neg
LOTE-25	0.077	0.062	111	0	Neg
LOTE-25	0.081	0.088	162	0	Neg
LOTE-25	0.087	0.125	237	0	Neg
LOTE-25	0.076	0.056	99	0	Neg
LOTE-25	0.080	0.081	148	0	Neg
LOTE-25	0.076	0.056	99	0	Neg
LOTE-25	0.083	0.100	186	0	Neg
LOTE-25	0.088	0.131	250	0	Neg
LOTE-25	0.078	0.075	136	0	Neg
LOTE-26	0.091	0.150	290	0	Neg
LOTE-26	0.096	0.188	371	0	Neg
LOTE-26	0.080	0.081	148	0	Neg
LOTE-26	0.088	0.131	250	0	Neg
LOTE-26	0.090	0.150	290	0	Neg
LOTE-26	0.095	0.175	343	0	Neg
LOTE-26	0.081	0.088	162	0	Neg
LOTE-26	0.077	0.062	111	0	Neg
LOTE-26	0.079	0.081	148	0	Neg
LOTE-26	0.081	0.088	162	0	Neg
LOTE-26	0.095	0.175	343	0	Neg
LOTE-26	0.081	0.088	162	0	Neg
LOTE-26	0.093	0.169	330	0	Neg
LOTE-26	0.091	0.150	290	0	Neg
LOTE-26	0.086	0.125	237	0	Neg
LOTE-27	0.072	0.031	52	0	Neg
LOTE-27	0.077	0.062	111	0	Neg
LOTE-27	0.105	0.237	477	0	Neg
LOTE-27	0.091	0.150	290	0	Neg
LOTE-27	0.086	0.125	237	0	Neg
LOTE-27	0.083	0.100	186	0	Neg
LOTE-27	0.094	0.169	330	0	Neg
LOTE-27	0.082	0.100	186	0	Neg
LOTE-27	0.080	0.081	148	0	Neg
LOTE-27	0.083	0.100	186	0	Neg
LOTE-27	0.085	0.119	225	0	Neg
LOTE-27	0.101	0.219	438	0	Neg
LOTE-27	0.094	0.169	330	0	Neg
LOTE-27	0.086	0.125	237	0	Neg
LOTE-27	0.084	0.106	198	0	Neg

LOTE-28	1.168	3.785	9774	8	Pos!
LOTE-28	1.095	3.535	9073	8	Pos!
LOTE-28	1.101	3.552	9120	8	Pos!
LOTE-28	0.945	3.014	7625	7	Pos!
LOTE-28	1.069	3.444	8819	8	Pos!
LOTE-28	0.862	2.726	6835	7	Pos!
LOTE-28	1.219	3.962	10274	9	Pos!
LOTE-28	0.779	2.434	6041	7	Pos!
LOTE-28	1.295	4.226	11022	9	Pos!
LOTE-28	0.974	3.111	7893	7	Pos!
LOTE-28	0.935	2.979	7529	7	Pos!
LOTE-28	1.112	3.594	9238	8	Pos!
LOTE-28	0.964	3.080	7808	7	Pos!
LOTE-28	1.311	4.285	11190	9	Pos!
LOTE-28	0.847	2.674	6693	7	Pos!
LOTE-29	0.091	0.045	78	0	Neg
LOTE-29	0.105	0.094	174	0	Neg
LOTE-29	0.148	0.247	499	0	Neg
LOTE-29	0.082	0.017	27	0	Neg
LOTE-29	0.088	0.035	59	0	Neg
LOTE-29	0.102	0.083	152	0	Neg
LOTE-29	0.098	0.069	124	0	Neg
LOTE-29	0.086	0.031	52	0	Neg
LOTE-29	0.098	0.069	124	0	Neg
LOTE-29	0.099	0.073	132	0	Neg
LOTE-29	0.089	0.042	72	0	Neg
LOTE-29	0.092	0.049	86	0	Neg
LOTE-29	0.086	0.031	52	0	Neg
LOTE-29	0.094	0.056	99	0	Neg
LOTE-29	0.101	0.083	152	0	Neg
LOTE-30	0.104	0.094	174	0	Neg
LOTE-30	0.089	0.042	72	0	Neg
LOTE-30	0.096	0.066	118	0	Neg
LOTE-30	0.090	0.045	78	0	Neg
LOTE-30	0.094	0.056	99	0	Neg
LOTE-30	0.085	0.028	46	0	Neg
LOTE-30	0.087	0.031	52	0	Neg
LOTE-30	0.100	0.08	146	0	Neg
LOTE-30	0.141	0.222	444	0	Neg
LOTE-30	0.093	0.056	99	0	Neg
LOTE-30	0.094	0.056	99	0	Neg
LOTE-30	0.088	0.035	59	0	Neg
LOTE-30	0.102	0.083	152	0	Neg
LOTE-30	0.099	0.073	132	0	Neg
LOTE-30	0.085	0.028	46	0	Neg

LOTE-31	1.121	3.625	9325	8	Pos!
LOTE-31	1.026	3.295	8404	8	Pos!
LOTE-31	0.953	3.042	7703	8	Pos!
LOTE-31	1.244	4.049	10520	7	Pos!
LOTE-31	1.186	3.851	9960	9	Pos!
LOTE-31	1.306	4.267	11139	8	Pos!
LOTE-31	0.778	2.434	6041	9	Pos!
LOTE-31	1.374	4.500	11803	7	Pos!
LOTE-31	0.939	2.993	7568	9	Pos!
LOTE-31	0.418	1.181	2746	7	Pos!
LOTE-31	0.945	3.014	7625	3	Pos!
LOTE-31	1.048	3.368	8607	7	Pos!
LOTE-31	1.113	3.597	9246	8	Pos!
LOTE-31	0.978	3.125	7932	8	Pos!
LOTE-31	1.065	3.431	8782	7	Pos!
LOTE-32	0.823	5.370	14311	11	Pos!
LOTE-32	0.683	4.355	11389	9	Pos!
LOTE-32	0.697	4.457	11680	9	Pos!
LOTE-32	1.102	7.391	20272	14	Pos!
LOTE-32	0.653	4.138	10772	9	Pos!
LOTE-32	0.745	4.804	12675	10	Pos!
LOTE-32	1.109	7.442	20424	14	Pos!
LOTE-32	0.856	5.609	15007	11	Pos!
LOTE-32	0.989	6.572	17836	12	Pos!
LOTE-32	0.847	5.543	14814	11	Pos!
LOTE-32	0.866	5.681	15217	11	Pos!
LOTE-32	0.679	4.326	11307	9	Pos!
LOTE-32	0.945	6.254	16897	12	Pos!
LOTE-32	0.873	5.732	15366	11	Pos!
LOTE-32	0.984	6.536	17729	12	Pos!
LOTE-33	0.089	0.051	89	0	Neg
LOTE-33	0.760	4.913	12989	10	Pos!
LOTE-33	0.718	4.609	12115	10	Pos!
LOTE-33	0.856	5.609	15007	11	Pos!
LOTE-33	0.422	2.464	6122	7	Pos!
LOTE-33	0.090	0.058	103	0	Neg
LOTE-33	0.168	0.623	1368	1	Pos!
LOTE-33	0.896	5.899	15854	11	Pos!
LOTE-33	0.628	3.957	10260	9	Pos!
LOTE-33	0.641	4.051	10526	9	Pos!
LOTE-33	0.098	0.116	219	0	Neg
LOTE-33	0.092	0.072	130	0	Neg
LOTE-33	0.745	4.804	12675	10	Pos!
LOTE-33	0.844	5.522	14753	11	Pos!
LOTE-33	0.499	3.022	7648	7	Pos!

LOTE-34	0.105	0.167	326	0	Neg
LOTE-34	0.080	0.000	1	0	Neg
LOTE-34	0.091	0.065	116	0	Neg
LOTE-34	0.103	0.152	294	0	Neg
LOTE-34	0.088	0.043	74	0	Neg
LOTE-34	0.097	0.109	205	0	Neg
LOTE-34	0.092	0.072	130	0	Neg
LOTE-34	0.092	0.072	130	0	Neg
LOTE-34	0.080	0.000	1	0	Neg
LOTE-34	0.092	0.072	130	0	Neg
LOTE-34	0.098	0.116	219	0	Neg
LOTE-34	0.102	0.145	279	0	Neg
LOTE-34	0.089	0.051	89	0	Neg
LOTE-34	0.094	0.087	160	0	Neg
LOTE-34	0.086	0.029	48	0	Neg
LOTE-35	0.094	0.087	160	0	Neg
LOTE-35	0.579	3.601	9258	8	Pos!
LOTE-35	0.594	3.710	9564	8	Pos!
LOTE-35	0.103	0.152	294	0	Neg
LOTE-35	0.613	3.848	9952	8	Pos!
LOTE-35	0.091	0.065	116	0	Neg
LOTE-35	0.088	0.043	74	0	Neg
LOTE-35	0.090	0.058	103	0	Neg
LOTE-35	0.076	0.000	1	0	Neg
LOTE-35	0.751	4.848	12802	10	Pos!
LOTE-35	0.094	0.087	160	0	Neg
LOTE-35	0.088	0.043	74	0	Neg
LOTE-35	0.586	3.652	9401	8	Pos!
LOTE-35	0.101	0.138	265	0	Neg
LOTE-35	0.099	0.123	233	0	Neg
LOTE-36	0.822	5.362	14288	11	Pos!
LOTE-36	0.416	2.420	6003	7	Pos!
LOTE-36	0.745	4.804	12675	10	Pos!
LOTE-36	0.336	1.841	4456	5	Pos!
LOTE-36	0.080	0.000	1	0	Neg
LOTE-36	0.084	0.014	22	0	Neg
LOTE-36	0.051	0.000	1	0	Neg
LOTE-36	0.779	5.051	13387	10	Pos!
LOTE-36	0.665	4.225	11019	9	Pos!
LOTE-36	0.300	1.580	3772	4	Pos!
LOTE-36	0.802	5.217	13867	10	Pos!
LOTE-36	0.709	4.543	11926	9	Pos!
LOTE-36	0.655	4.152	10812	9	Pos!
LOTE-36	0.098	0.116	219	0	Neg
LOTE-36	0.082	0.000	1	0	Neg

LOTE-37	0.119	0.268	545	0	Neg
LOTE-37	0.103	0.152	294	0	Neg
LOTE-37	0.086	0.029	48	0	Neg
LOTE-37	0.084	0.014	22	0	Neg
LOTE-37	0.096	0.101	188	0	Neg
LOTE-37	0.084	0.014	22	0	Neg
LOTE-37	0.092	0.072	130	0	Neg
LOTE-37	0.106	0.174	341	0	Neg
LOTE-37	0.102	0.145	279	0	Neg
LOTE-37	0.096	0.101	188	0	Neg
LOTE-37	0.086	0.029	48	0	Neg
LOTE-37	0.098	0.116	219	0	Neg
LOTE-37	0.088	0.043	74	0	Neg
LOTE-37	0.094	0.087	160	0	Neg
LOTE-37	0.089	0.051	89	0	Neg
LOTE-38	0.407	2.355	5827	6	Pos!
LOTE-38	0.801	5.210	13847	10	Pos!
LOTE-38	0.197	0.833	1877	2	Pos!
LOTE-38	0.151	0.500	1076	0	Neg
LOTE-38	0.109	0.196	388	0	Neg
LOTE-38	0.099	0.123	233	0	Neg
LOTE-38	0.082	0.000	1	0	Neg
LOTE-38	0.088	0.043	74	0	Neg
LOTE-38	0.112	0.217	433	0	Neg
LOTE-38	0.235	1.109	2564	3	Pos!
LOTE-38	0.096	0.101	188	0	Neg
LOTE-38	0.098	0.116	219	0	Neg
LOTE-38	0.103	0.152	294	0	Neg
LOTE-38	0.242	1.159	2691	3	Pos!
LOTE-38	0.092	0.072	130	0	Neg
LOTE-39	0.109	0.196	388	0	Neg
LOTE-39	0.127	0.326	675	0	Neg
LOTE-39	0.100	0.130	248	0	Neg
LOTE-39	0.096	0.101	188	0	Neg
LOTE-39	0.092	0.072	130	0	Neg
LOTE-39	0.086	0.029	48	0	Neg
LOTE-39	0.113	0.225	451	0	Neg
LOTE-39	0.113	0.225	451	0	Neg
LOTE-39	0.111	0.210	418	0	Neg
LOTE-39	0.098	0.116	219	0	Neg
LOTE-39	0.098	0.116	219	0	Neg
LOTE-39	0.107	0.181	356	0	Neg
LOTE-39	0.096	0.101	188	0	Neg
LOTE-39	0.095	0.094	174	0	Neg
LOTE-39	0.105	0.167	326	0	Neg

LOTE-40	0.103	0.152	294	0	Neg
LOTE-40	0.126	0.319	659	0	Neg
LOTE-40	0.080	0.000	1	0	Neg
LOTE-40	0.092	0.072	130	0	Neg
LOTE-40	0.107	0.181	356	0	Neg
LOTE-40	0.112	0.217	433	0	Neg
LOTE-40	0.084	0.014	22	0	Neg
LOTE-40	0.105	0.167	326	0	Neg
LOTE-40	0.087	0.036	61	0	Neg
LOTE-40	0.102	0.145	279	0	Neg
LOTE-40	0.104	0.159	309	0	Neg
LOTE-40	0.081	0.000	1	0	Neg
LOTE-40	0.095	0.094	174	0	Neg
LOTE-40	0.108	0.188	371	0	Neg
LOTE-40	0.089	0.051	89	0	Neg
LOTE-41	0.135	0.384	807	0	Neg
LOTE-41	0.135	0.384	807	0	Neg
LOTE-41	0.151	0.500	1076	0	Neg
LOTE-41	0.145	0.457	976	0	Neg
LOTE-41	0.228	1.058	2436	3	Pos!
LOTE-41	0.135	0.384	807	0	Neg
LOTE-41	0.290	1.507	3582	4	Pos!
LOTE-41	0.310	1.652	3959	4	Pos!
LOTE-41	0.120	0.275	561	0	Neg
LOTE-41	0.149	0.486	1043	0	Neg
LOTE-41	0.125	0.312	644	0	Neg
LOTE-41	0.141	0.428	908	0	Neg
LOTE-41	0.116	0.246	497	0	Neg
LOTE-41	0.133	0.370	775	0	Neg
LOTE-41	0.118	0.261	530	0	Neg
LOTE-42	0.083	0.100	186	0	Neg
LOTE-42	0.114	0.294	603	0	Neg
LOTE-42	0.120	0.331	686	0	Neg
LOTE-42	0.083	0.100	186	0	Neg
LOTE-42	0.087	0.125	237	0	Neg
LOTE-42	0.076	0.056	99	0	Neg
LOTE-42	0.074	0.05	87	0	Neg
LOTE-42	0.120	0.331	686	0	Neg
LOTE-42	0.096	0.188	371	0	Neg
LOTE-42	0.095	0.175	343	0	Neg
LOTE-42	0.089	0.144	277	0	Neg
LOTE-42	0.076	0.056	99	0	Neg
LOTE-42	0.119	0.331	686	0	Neg
LOTE-42	0.113	0.287	588	0	Neg
LOTE-42	0.124	0.356	743.	0	Neg