

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Medicina Veterinária

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Ana Caroline Doyle Torres

**Ocorrência, co-infecções e diversidade molecular do vírus da
doença de Marek em Minas Gerais**

Belo Horizonte

2021

Ana Caroline Doyle Torres

**Ocorrência, co-infecções e diversidade molecular do vírus da
doença de Marek em Minas Gerais**

Versão Final

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins

Co-orientadores: Dr^a Sandra Yulliet Marín Gómez

Dr^a Roselene Ecco

Belo Horizonte

2021

T693o Torres, Ana Caroline Doyle, 1989 -
Ocorrência, co-infecções e diversidade molecular do vírus da doença de Marek em Minas Gerais/ Ana Caroline Doyle Torres. -2021.
103 f.:il

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins

Coorientadores: Roselene Ecco

Sandra Yulliet Marin Gómez

Tese (Doutorado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Doutora.

Bibliografias: f. 44 a 52

Anexos: f. 62 a 102.

1. Galinha - Teses - 2. Marek, doença de - Teses - 3. Virologia veterinária - Teses - I. Martins, Nelson Rodrigo da Silva - II. Ecco, Roselene - III. Gómez, Sandra Yulliet Marin - IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - V. Título.

CDD - 636 089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes - CRB2569

Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANA CAROLINE DOYLE TORRES

Tese **Ocorrência, co-infecções e diversidade molecular do vírus da doença de Marek em Minas Gerais** submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovada em 29 de junho de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Nelson Rodrigo da Silva Martins
Presidente – Orientador(a)

Dr.(a). Mauricio Resende

Dr.(a). Priscilla Rochele Barrios

Dr.(a). Bruno Antunes Soares

Dr.(a). Bruna Antonia Melchhiades Bretz



Documento assinado eletronicamente por **Nelson Rodrigo da Silva Martins, Professor do Magistério Superior**, em 30/06/2021, às 16:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0799387** e o código CRC **BDD121D1**.

À minha filha, Maria Luísa, por ser meu tudo. Minha vida. Meu amor. Te amo, Malú!!

Ao meu companheiro, Dionei por estar sempre ao meu lado em todos os momentos. Te amo!!

À minha mãe, irmã e ao meu pai. Obrigada por estarem sempre comigo. Mesmo longe estamos juntos! Amo vocês!

Aos meus avós, Nelcy e Elso. Obrigada por me amarem tanto. A falta que vocês fazem aqui é imensa. Amo vocês eternamente!!

Á Deus por ser meu alicerce e força! Obrigada, Senhor!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por estar sempre me mostrando o caminho a seguir;

Aos meus queridos avós Nelcy e Elso! Queria muito ter tido mais tempo ao lado de vocês. Infelizmente não foi possível. Obrigada por cada momento. Cada abraço. Cada sorriso. Obrigada por todo o amor que vocês me deram. Meu pensamento está sempre com vocês! Que Deus esteja sempre cuidando de vocês aí no céu. Amo vocês! Vozinha, te amo!

À minha filha, Maria Luísa, por ser a luz da minha vida. Obrigada por ter me escolhido como tua mãe. Te amo do tamanho do céu, meu amor!!

Ao meu companheiro Dionei por estar sempre ao meu lado em todos os momentos. Te amo, amor!

Aos meus pais por me darem o suporte materno e paterno sempre! Muito obrigada. Amo vocês!

À minha irmã por ser minha amiga e companheira. Obrigada!! Te amo, gatinha!!

Ao meu querido orientador Nelson Rodrigo por ser uma pessoa de alma leve e tranquila. Obrigada pela orientação e mais ainda obrigada pelo carinho de pai que o senhor sempre teve comigo e com seus orientados. Muito obrigada!!

Às minhas Co-orientadoras Sandra e Roselene pelos ensinamentos! Muito obrigada!

Aos professores Maurício Resende e Sérgio Resende por todo carinho que sempre destinaram a minha pessoa. Muito obrigada!!

A Camila Siqueira por ser essa pessoa que eu sei que sempre posso e poderei contar. Você é uma pessoa iluminada e cheia de amor para dar. Obrigada por ser minha amiga!!

A Priscila Pinto por ser uma amiga sempre presente e disposta a ajudar. Pri, muito obrigada por estar presente em minha vida. Obrigada!! Você é uma pessoa sem igual!

À Una Itabira por me proporcionar o sonho de ser professora e hoje coordenadora dos cursos de Agronomia e Medicina Veterinária!

Aos meus queridos alunos dos cursos de Agronomia e Medicina Veterinária!! Obrigada pelo carinho de vocês!!

Agradeço ao universo por estar sempre me proporcionando momentos únicos! Obrigada!! Sou grata por todos os momentos.

RESUMO

A doença de Marek (MD) é uma enfermidade vírica que atinge aves domésticas (*Gallus gallus domesticus*), causada por um herpesvírus. É uma doença de ocorrência e importância mundial, visto que, possui um grande impacto econômico na indústria avícola em função dos custos de vacinação, mortalidade, condenações de carcaças e diminuição na produção de ovos. Desde o surgimento da avicultura intensificada, especialmente no início do século 20, iniciou-se a evolução de Vírus da Doença de Marek (MDV) para maior patogenicidade. Paradoxalmente, a criação das vacinas no início dos anos 1970, resultou em pressão seletiva que aumentou com a geração de estirpes de progressivamente maior patogenicidade, com diversificação dos quadros patológicos. Nos últimos anos o gene *Meq* tem atraído a atenção como uma possível causa do aumento da oncogenicidade, o mais importante determinante de patogenicidade de MDV. A caracterização molecular de estirpes brasileiras de MDV revelou a presença de estirpes muito virulentas (vvMDV), tanto da avicultura industrial como de subsistência. Considerando que os agentes infecciosos não se apresentam isoladamente no organismo do animal desafiado, o quadro decorrente de infecções simultâneas é por si só um desafio extremo para a ave, principalmente quando associados aos fatores estressantes da intensificação, como estresse, superlotação, competição social, canibalismo, má nutrição, desconforto térmico e inadequado bem-estar, fazendo com que o sistema imune da ave afetada não consiga debelar a infecção.

Palavras-chave: *Gallus Gallus domesticus*, herpesvírus, avicultura, patogenicidade, infecções simultâneas.

ABSTRACT

Marek's disease (MD) is a viral disease that affects poultry (*Gallus gallus domesticus*), caused by a herpesvirus. It is a disease of global importance and occurrence, since it has a great economic impact on the poultry industry due to the costs of vaccination, mortality, carcass condemnations and decreased egg production. Since the emergence of intensified poultry farming, especially at the beginning of the 20th century, the evolution of Marek's Disease Virus (MDV) has started towards greater pathogenicity. Paradoxically, the creation of vaccines in the early 1970s resulted in selective pressure that increased with the generation of strains of progressively greater pathogenicity, with diversification of pathological conditions. In recent years, the *Meq* gene has attracted attention as a possible cause of increased oncogenicity, the most important determinant of MDV pathogenicity. The molecular characterization of Brazilian strains of MDV revealed a presence of very virulent strains (vvMDV), both from industrial and subsistence poultry farming. Considering that the infectious agents do not appear in isolation in the organism of the challenged animal, the situation resulting from simultaneous alterations is in itself an extreme challenge for the bird, especially when associated with intensifying stressors, such as stress, overcrowding, social competition, cannibalism, malnutrition, thermal discomfort and appropriate well-being, making the immune system of the affected bird unable to suppress an infection.

Keywords: *Gallus Gallus domesticus*, herpesvirus, poultry, pathogenicity, concurrent infections.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
CAPÍTULO 1- VÍRUS DA DOENÇA DE MAREK: DEFINIÇÕES E CARACTERÍSTICAS	11
1.1. RESUMO	11
1.2. INTRODUÇÃO	11
1.3. BREVE HISTÓRICO DA DOENÇA DE MAREK.....	12
1.4. A DOENÇA DE MAREK.....	13
1.5. ETIOLOGIA	14
1.6. PATOGENIA.....	15
1.7. EPIDEMIOLOGIA	16
1.8. A DOENÇA DE MAREK NO BRASIL.....	18
1.9. DOENÇA DE MAREK NO MUNDO.....	20
1.10. INCUBAÇÃO	23
1.11. DIAGNÓSTICO	24
1.12. CONTROLE E PREVENÇÃO	25
CAPÍTULO 2-EVOLUÇÃO DE VIRULÊNCIA E EMERGÊNCIA DE DOENÇA DE MAREK.....	29
RESUMO	29
INTRODUÇÃO	29
2.1. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS DO VÍRUS DA DOENÇA DE MAREK	30
2.2. AUMENTO DA VIRULÊNCIA.....	32
CAPÍTULO 3- VÍRUS DA DOENÇA DE MAREK E COINFECÇÕES: O SINERGISMO ENTRE PATÓGENOS.....	37
RESUMO	37
INTRODUÇÃO	37
3.10 PAPEL DAS COINFECÇÕES EM ANIMAIS INFECTADOS POR MDV	38

OBJETIVOS	41
- GERAL.....	41
- ESPECÍFICOS.....	41
CAPÍTULO 4. MATERIAL E MÉTODOS.	42
4.1 AVES	42
4.2. COLETA DE AMOSTRAS.....	42
4.3. EXTRAÇÃO DE DNA	42
4.4.OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.	43
4.5.CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS ANALISADOS.	44
REFERÊNCIAS	45
RESULTADOS.....	55
DISCUSSÃO	59
REFERÊNCIAS.	61
CONCLUSÕES.	63
ANEXOS.	64
ANEXO 1- AUMENTO DE VIRULÊNCIA DE MDV EM MINAS GERAIS.....	64
ANEXO 2-CASOS NATURAIS DE COINFECCÃO COM VÍRUS DA DOENÇA DE MAREK	74
ANEXO 3 - REVISÃO DE LITERATURA SOBRE AS PRINCIPAIS ZONOSSES BACTERIANAS PRESENTES EM AVES DOMÉSTICAS E SILVESTRES	89
ANEXO 4-FRANGOS DE CORTE COM OBSTRUÇÃO INTESTINAL POR <i>Ascaridia galli</i>.....	102

INTRODUÇÃO

A doença de Marek (MD) é uma enfermidade viral que atinge aves domésticas (*Gallus gallus domesticus*) e outras aves de *Galliformes*, causada por um integrante de Alphaherpesvirinae. É uma doença de ocorrência e importância mundial, visto que, possui um grande impacto econômico na indústria avícola em função dos custos de vacinação, mortalidade, condenações de carcaças e diminuição na produção de ovos (LANDMAN; VERSCHUREN, 2003; WITTER; SCHAT, 2003; SCHAT; NAIR, 2008). MD é uma doença neoplásica altamente infecciosa afetando, principalmente, as galinhas, mas em alguns casos também perus. A forma clássica da doença é caracterizada por tumores na pele, músculos e órgãos viscerais (BURNSIDE; BERNBERG; ANDERSONN, 2006).

A transmissão é horizontal e as formas infecciosas do vírus da doença de Marek (MDV) são produzidas no epitélio dos folículos das penas, cujas células em descamação possibilitam alta proteção ao vírus, assim como sua disseminação aerógena (CALNEK; HITCHNER, 1969; CALNEK; AKDINGER; KAHN, 1970a; CALNEK; UBERTINI; ADLDINGER, 1970b; BAIGENT; KGOSANA; GAMAWA, 2013). A criação de aves de forma altamente intensificada favorece a rápida disseminação do agente entre os animais, ocorrendo à infecção por inalação da poeira contaminada com o vírus (CALNEK; HITCHNER, 1969; FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012).

A imunocompetência deprime a expressão viral e induz à latência (HEIDARI et al., 2010). A doença é controlada no Brasil com sucesso pela vacinação no 18º dia embrionário ou 1º dia após a eclosão (BRASIL, 2007). Embora as vacinas tenham obtido sucesso em reduzir as perdas relacionadas à doença, a estratégia de vacinação não foi muito eficaz em impedir a evolução do vírus no sentido de maior virulência (NAIR, 2005). Com isso, essa enfermidade viral é considerada endêmica nas regiões de avicultura intensificada e as estirpes de campo têm evoluído progressivamente para MDV de maior virulência (vvMDV) (TULMAN et al.,

2000), possivelmente sob pressão evolutiva da imunidade dos plantéis vacinados como foi descrito na Argentina (BUSCAGLIA; NERVI; RISSO, 2004). Os sinais característicos da doença crônica têm sido cada vez menos relatados, tendo em vista o aumento da virulência de MDV. Com isso, achados de necropsia como, por exemplo, opacidade da córnea associada ao aumento no volume de vísceras e gônadas, assim como, coloração acinzentada difusa destes órgãos tem sido cada vez menos encontrados durante a necropsia das aves (CHAT; NAIR, 2008; FRANCO et al., 2012).

Sabe-se que a vacinação reduz, mas não impede a infecção nem a excreção viral, o que favorece a seleção de estirpes mutantes e, conseqüentemente, problemas para o controle desta enfermidade (WITTER; CHAT, 2003). Isolados de campo de alguns países demonstraram que MDV está em crescente aumento de sua virulência (RAJA et al., 2009). Estirpes patogênicas desse vírus foram classificadas como de baixa patogenicidade (mMDV), virulentas (vMDV), alta virulência (vvMDV) e alta virulência plus (vv+MDV) com base na capacidade do vírus em resistir a imunidade induzida pela vacinação (LIU; KUNG, 2000). Portanto, estirpes de MDV muito virulentas podem causar futuros surtos da doença apesar da vacinação.

Em busca por fatores virais relacionados à formação de tumores e à condição de latência no nervo trigêmeo foi possível identificar a proteína viral *Meq* como uma oncoproteína a qual codifica trezentos e trinta e nove aminoácidos (JONES et al., 1992b). Mutações pontuais na codificação destes aminoácidos sustentam a teoria do aumento da virulência de MDV. Embora estirpes de MDV de maior virulência tenham sido relatadas em diversos países e em diferentes anos, no Brasil não há estudos publicados referentes à pesquisa de estirpes de alta virulência. A pesquisa e caracterização de MDV de alta virulência na avicultura familiar é estratégica e, poderá permitir a determinação do risco à avicultura industrial.

DESENVOLVIMENTO

CAPÍTULO 1- VÍRUS DA DOENÇA DE MAREK: DEFINIÇÕES E CARACTERÍSTICAS

RESUMO

O vírus da doença de Marek (MDV) é uma das mais importantes etiologias na avicultura industrial, pelo seu significado como causador de doença imunodepressora, inflamatória e tumoral. Desde o surgimento da avicultura intensificada, especialmente no início do século 20, iniciou-se a evolução de MDV para maior patogenicidade. Paradoxalmente, a criação das vacinas no início dos anos 1970, resultou em pressão seletiva que aumentou com a geração de estirpes de progressivamente maior patogenicidade, com diversificação dos quadros patológicos. A tendência culminou com a descrição de estirpes vvMDV em meados dos anos 1980 na Europa e Estados Unidos, capazes de superar a imunidade derivada das vacinas monovalentes, condição que forçou, em várias regiões avícolas, a adoção de vacinas bi ou trivalentes.

INTRODUÇÃO

A doença de Marek descoberta em 1907 por József Marek representou grandes avanços em relação aos impactos sofridos na avicultura em função da enfermidade. Desde então, grandes avanços foram alcançados em relação a caracterização do Vírus da Doença de Marek(MDV) no decorrer das décadas. Alguns pontos chave em relação a disseminação da doença já são sedimentados como, por exemplo, as formas de disseminação assim como as maneiras de persistência do agente em um plantel e mais ainda nas instalações na troca entre lotes. Bem como os principais pontos de multiplicação do agente no organismo animal caracterizando-se por nervos periféricos como, por exemplo, nervo ciático, pelo braquial, nervo trigêmeo e nervo vago e órgãos como timo, baço e Bursa de Fabricius.

Hoje devido aos avanços nos estudos moleculares, sabe-se que o principal gene envolvido em substituições e conseqüentemente nas mutações de aminoácidos é o oncogene *Meq*. Através de mutações pontuais em posições pré-determinadas é possível caracterizar uma estirpe de

MDV conforme seu potencial de virulência. No entanto, devida a alta capacidade de rearranjo do MDV atualmente têm-se uma ampla diversidade de variantes circulantes no mundo. Dessa forma, estudos moleculares aprofundados na questão do aumento da virulência do MDV se fazem extremamente necessários para que os métodos de prevenção da doença consigam alcançar essa evolução de maneira igualitária. Isso se faz necessário, pois a vacinação é o principal método de controle da doença entre os plantéis avícolas mundiais.

1.1-BREVE HISTÓRICO DA DOENÇA DE MAREK

A doença de Marek (MD) em galinhas foi primeiro relatada na Hungria em 1907 pelo veterinário pesquisador József Marek, caracterizada por polineurite e paralisia resultantes de infiltração linfóide tumoral e inflamação em nervos periféricos (MAREK, 1907; BIGGS, 2000).

Apesar disso, a doença adquiriu maior importância e impacto durante o século XX quando a avicultura industrial apresentou crescimento exponencial, sendo que surtos da doença foram reconhecidos nos EUA (Estados Unidos da América) a partir de 1914, e subsequentemente, na Nova Zelândia, Grã-Bretanha, Holanda e vários outros países (SCHAT; NAIR, 2008; CANAL; BARBOSA, 2009).

Alguns anos mais tarde a polineurite foi associada com o desenvolvimento de tumores em órgãos viscerais (PAPPENHEIMER; DUNN; CONE, 1926) e com isso a doença tornou-se conhecida como —neurolinfomatose gallinarum| ou neurolinfomatose das galinhas. Por muitos anos houve dificuldade na distinção entre a doença de Marek de outra condição neoplásica de linfócitos, a leucose linfóide, até que Biggs (1961) propôs uma nova classificação com base na faixa etária afetada, distribuição tecidual e histopatogenia.

Contudo, a identificação do vírus da doença de Marek (MDV) foi realizada no final dos anos de 1960 (BIGGS et al., 1968; CHURCHILL; PAYNE; CHUBB, 1967; NAZERIAN et al., 1968; PURCHASE; BIGGS; PAYNE, 1967). Desde então, essa enfermidade tem sido alvo de muitas pesquisas, tendo em vista que a doença já foi relatada na maioria dos países, visto sua importância econômica e científica.

1.2-A DOENÇA DE MAREK

A doença de Marek (MD) é causada por estirpes de MDV do sorotipo 1, caracterizada por ser doença linfoproliferativa e principalmente de galinhas (*Gallus gallus domesticus*). O processo linfoproliferativo que ocorre em uma ave infectada pelo MDV, pode envolver a maioria dos órgãos e tecidos, incluindo os nervos periféricos (BIGGS, 2000; OIE, 2010; SCHAT; NAIR, 2013; WITTER; SCHAT, 2003). As infecções por MDV em galinhas podem resultar em uma grande variedade de formas clínicas, sendo que a forma aguda é uma das mais virulentas, podendo afetar aves de três a quatro semanas de idade, as menores idades em infecções experimentais, ou mais velhas (OIE, 2010; SCHAT; NAIR, 2013; WITTER; SCHAT, 2003). No entanto, segundo Payne e Venugopal (2000) a forma aguda da MD pode ocorrer mais comumente entre três a seis meses de idade. A doença de Marek em sua forma clássica acomete principalmente galinhas de doze a quatorze semanas de idade, ocasionando infiltração linfóide tumoral dos nervos periféricos, especialmente nervo ciático e de vários órgãos como, por exemplo, gônadas, fígado, baço, pulmões, pele, coração e rins. Na forma aguda, os tumores viscerais podem levar à morte súbita em dois a cinco dias sem a presença de paralisia e sem que a evolução tumoral seja detectável microscopicamente. Os animais afetados morrem entre sete a vinte dias após o aparecimento dos sinais clínicos, em função, principalmente, da caquexia pela alimentação insuficiente. Além do fato de que há um grande problema econômico referente à refugagem no abatedouro devido, principalmente a presença de tumores cutâneos ou viscerais (GIMENO, 2009; OIE, 2010; RUPLEY, 1999; SCHAT; NAIR, 2013; WITTER; SCHAT, 2003).

Essa é uma doença a qual existe em praticamente todas as galinhas criadas de forma intensiva em todo mundo. Além de ser considerada a doença de maior impacto na avicultura de subsistência. A exposição ao agente etiológico pode ocorrer logo após a eclosão do pinto, sendo que a doença pode ocorrer de forma esporádica durante todo o tempo de vida das galinhas, assim como também na forma de surtos agudos onde mais de 50% das aves podem sucumbir dentro de algumas semanas (BUSCAGLIA; NERVI; RISSO, 2004).

1.3-ETIOLOGIA

A doença de Marek é uma enfermidade linfoproliferativa de galinhas (*Gallus gallus domesticus*), causada por um herpesvirus oncogênico, o vírus da doença de Marek (MDV), sendo patogênicas apenas as estirpes do sorotipo 1. MDV, também denominado *Gallid Herpesvirus 2* – GaHV-2, é classificado no gênero *Mardivirus*, da família Herpesviridae e sub-família Alphaherpesviridae. Estirpes dos sorotipos 2 e 3 são naturalmente não oncogênicos.

O genoma é constituído de uma fita dupla de DNA linear, com o tamanho de aproximadamente 160 a 180 mil pares de bases, que comporta de 70 a 80 genes e codifica 103 proteínas (OSTERRIEDER et al., 2006). É um vírus estritamente associado à célula (BIGGS et al., 1968), estabelece latência nos linfócitos (SHEK et al., 1983), inclui um oncogene em seu genoma (JONES et al., 1992b), além da capacidade de induzir a linfomas (SEVOIAN; CHAMBERLAIN; COUNTER, 1962; BIGGS; PAYNE, 1963; BIGGS; PAYNE, 1967).

As partículas virais (vírions), são achadas no núcleo, e mais raramente no citoplasma e espaços extracelulares. As partículas virais do epitélio do folículo da pena medem 273 - 400 nm em diâmetro e possuem aparência amorfa. MDV causa linfomas de células T e infiltrado mononuclear dos nervos periféricos em frangos susceptíveis em poucas semanas, e estirpes vMDV (alta virulência) e vvMDV (muito alta virulência) causam tumores em alguns dias após a infecção experimental. Entre todos os herpesvírus, MDV apresenta o maior grau de afinidade com células CD4, em que ocorre latência e transformação, à qual seu genoma está associado e com baixa expressão proteica, sendo o vírus menos citolítico da família. Entretanto, a infecção é lítica em linfócitos B na bolsa cloacal (OIE, 2010; OSTERRIEDER et al., 2006; SCHAT; NAIR, 2013; WITTER; SCHAT, 2003).

MDV de campo podem ser agrupados em quatro patotipos com base na capacidade do vírus em resistir a imunidade induzida pela vacinação, em estirpes de baixa virulência (mild, mMDV), estirpes de alta virulência (virulent, vMDV); estirpes de muito alta virulência (very virulent, vvMDV) e estirpes de altíssima virulência (very virulent plus, vv+ MDV) (OIE, 2010; OSTERRIEDER et al., 2006; SCHAT; NAIR, 2013; WITTER; SCHAT, 2003).

1.4-PATOGENIA

A patogenia da doença de Marek é complexa e ainda não totalmente compreendida. A transmissão do agente para outra ave ocorre pela via respiratória, através da inalação de poeira contaminada com descamações de pele contendo MDV infectante e livre de células. Inicialmente, o vírus é replicado nas células epiteliais do trato respiratório, após infecta os macrófagos locais. A partir dos pulmões o vírus é transportado sistemicamente para o baço, timo e bursa de Fabricius (BF). Na BF e partir desses órgãos, o vírus infecta os linfócitos B e T atingindo o pico de replicação entre os dias três a sete pós infecção.

Neste período inicial da infecção a interação de MDV com as células é citolítica, especialmente linfócitos B, resultando em atrofia da BF e redução da celularidade do timo causando, assim, uma grave imunodepressão (SCHAT; NAIR, 2013). Após a fase citolítica inicial, a infecção passa a fase de latência, principalmente nos linfócitos T CD4+, mas também em CD4-CD8-, CD8+ e linfócitos B, a partir de seis a oito dias pós infecção. Durante esse período o vírus pode ser transportado até a pele, onde ocorre infecção produtiva nos folículos das penas. Em linfócitos, MDV é um vírus estritamente associado às células, sendo que partículas virais livres somente são produzidas pela replicação no epitélio dos folículos das penas. A partir da replicação no epitélio do folículo da pena, o vírus é excretado para o meio ambiente, geralmente entre o décimo e o décimo quarto dia pós infecção. A terceira fase de infecção consiste na infecção citolítica secundária, onde há o envolvimento do sistema nervoso.

Nessa fase, lesões líticas e inflamatórias podem ser detectadas no cérebro e nos nervos das galinhas adultas, por volta do nono ao décimo quinto dia pós infecção. Uma quarta fase da infecção ocasionada pelo MDV é caracterizada pelo desenvolvimento de linfomas malignos de linfócitos T, os quais se formam a partir do décimo segundo dia pós-infecção. A divisão da patogenia por fases, pode não se mostrar tão definitivamente separada quando a infecção

ocorre com estirpes de MDV de alta virulência (OSTERRIEDER et al., 2006; SCHAT; NAIR, 2013).

Há indicações de relação entre latência e transformação de linfócitos, etapas de interação parasito-hospedeiro que não são facilmente distinguíveis. Provavelmente, a infecção latente é requerida para que ocorra a formação tumoral pelo vírus da doença de Marek. A polineurite crônica, observada na forma clássica da MD e os linfomas viscerais da forma aguda, estão ocorrendo cada vez com menor frequência (OIE, 2010). Assim, portanto, a infecção por MDV em galinhas resulta em aves portadoras e disseminadoras constantes do vírus no meio ambiente.

Nos últimos vinte anos os sinais clínicos neurológicos centrais têm sido dominantes, caracterizados pela forma de paralisia transitória ocasionada pela infecção do sistema nervoso central. Assim como a paralisia transitória, na maioria das linhagens de galinhas, os episódios da forma aguda da doença têm sido relacionados com estirpes de vvMDV, sendo que a forma aguda da MD tem se apresentado cada vez em maior ocorrência (OIE, 2010; WITTER; SCHAT, 2003).

1.5-EPIDEMIOLOGIA

MDV replica-se nas células epiteliais da camada de queratina do folículo da pena e, as descamações epiteliais apresentam-se como principal fonte de contaminação para o meio ambiente e inalação por aves susceptíveis (PAYNE; VENUGOPAL, 2000). Tendo em vista o sistema de criação das galinhas caipiras onde há coexistência de aves em diferentes faixas etárias, esse fator é determinante para a persistência do agente no ambiente o qual essas aves estão localizadas. Sendo assim, a cada inserção de novas aves no local, os animais são automaticamente infectados tornando-se carreadores e disseminadores da doença para o restante das aves, assim como para o ambiente onde vivem.

A transmissão de MDV ocorre através do contato direto ou indireto entre as aves, ocorrendo principalmente por via aérea (CALNEK; WITTER, 1997). O folículo da pena é o local primário de produção de vírus completo e transmissível e a descamação de células epiteliais

infectadas durante a nova formação do empenamento, apresenta-se como a principal fonte de contaminação para o meio ambiente (CALNEK; AKDINGER; KAHN, 1970a; ALDINGER; CALNEK, 1973). Isto favorece a contínua contaminação dos galpões por muitos meses. Não há evidências de transmissão vertical do vírus, embora este possa ser encontrado aderido à casca dos ovos, possibilitando a exposição do pinto no momento da eclosão (OSTERRIEDER et al., 2006; SCHAT; NAIR, 2013; WITTER; SCHAT, 2003).

MDV pode persistir por longos períodos no meio ambiente e é tão ubíquo que, virtualmente, todas as aves domésticas do mundo acabam entrando em contato com o agente em alguma das fases de suas vidas, considerado típico o desafio aos três dias de idade (OIE, 2010; OSTERRIEDER et al., 2006; SCHAT; NAIR, 2013; WITTER; SCHAT, 2003). A infecção em outras espécies é rara, mas, ocasionalmente, ocorre em perus e codornizes (PAYNE; VENUGOPAL, 2000).

Um episódio recente de doença por *Gallid Herpesvirus 2* foi descrito em pavão (*Pavo cristatus*) no Parque Zoológico de Brasília, caracterizado por linfomatose visceral em histopatologia, com a detecção por PCR e sequenciamento da região que codifica a proteína *Meq*. Nenhuma outra ave da ordem Galliformes examinada no Parque, incluindo *Aburria kujubi*, *Aburria jacutinga*, *Crax alector*, *Crax blumembachii*, *Crax fasciolata*, *Pauxi tuberosum*, *Nothocrax urumutum*, *Pavo cristatus*, *Penelope obscura*, *Penelope supercilialis*, *Penelope ochrogaster*, *Lophura nycthemera* foi positiva para *Meq* (BLUME et al., 2016).

Apesar de MDV ser sensível à maioria dos desinfetantes e detergentes devido ao seu envelope lipídico, ele apresenta alta resistência e longevidade no meio ambiente. Dentro das células descamadas na cama do galpão ele pode ser mantido viável à temperatura ambiente por dezesseis semanas. Penas ressecadas de aves infectadas podem manter a infectividade por oito meses à temperatura ambiente e à poeira dos galpões por, no mínimo, quatro a seis meses. O MDV apresenta maior resistência em temperaturas mais baixas, sendo que a doença pode se agravar durante o inverno principalmente em sistemas de criação com ambientes fechados (OIE, 2010; OSTERRIEDER et al., 2006; SCHAT; NAIR, 2013; WITTER; SCHAT, 2003). O período de transmissão do vírus pelo animal infectado inicia-se cerca de duas a quatro semanas após a infecção, sendo que este período de transmissão pode estender-se por toda a

vida da ave. Muitas galinhas podem não apresentar sinais clínicos característicos da enfermidade, tornando-se desta forma, portadoras assintomáticas e assim transmitirem o vírus continuamente para outras aves. A morbidade é variável de acordo com a suscetibilidade do plantel ou linhagem, a patogenicidade da amostra, a dose infectante, a presença de anticorpos maternos, fatores ambientais e presença de coinfeções (CANAL; BARBOSA, 2009; OIE, 2010; OSTERRIEDER et al., 2006; SANTOS; MOREIRA; DIAS, 2008; ROSS, 1998; SCHAT; NAIR, 2013; WITTER; SCHAT, 2003).

1.6-A DOENÇA DE MAREK NO BRASIL

A doença de Marek tem sido amplamente estudada por pesquisadores no mundo todo, no entanto, as pesquisas no Brasil apresentam-se escassas, principalmente em relação ao quesito aumento da virulência do vírus. O MDV no Brasil, segundo Back (2004) têm sido diagnosticado tanto em matrizes pesadas quanto em frangos de corte e poedeiras, visto que a produção de aves é desenvolvida de forma altamente intensificada, favorecendo com isso a rápida disseminação do vírus entre as aves de um ou diferentes plantéis. As galinhas da avicultura de subsistência, essa população de aves em específico, representa hoje um perigo iminente para a avicultura industrial, pois a vacinação contra a MD não ocorre nesse grupo de aves, sendo que desta forma o vírus mantêm-se circulante no meio ambiente indefinidamente. Dessa forma esse grupo de aves torna-se uma fonte inesgotável de MDV assim como de diversos outros patógenos, principalmente para a avicultura industrial, que por sua vez, têm como única solução em vista, blindar-se o máximo possível contra a introdução desses agentes infecciosos em seus plantéis. A detecção de GaHV-2 em linfomatose fatal em pavão (*Pavo cristatus*) pode indicar uma epidemiologia mais complexa (BLUME et al., 2016).

Abreu et al. (2016) descreveram a doença de Marek em galinhas fundo de quintal com base em lesões microscópicas no município de Carapebus, município do Rio de Janeiro. No local eram criados frangos de corte e galinhas poedeiras sob um sistema extensivo de criação. As aves não apresentaram manifestação clínica da doença, no entanto, nódulos esbranquiçados foram encontrados nas vísceras dessas aves durante as necropsias. Todas as aves foram vacinadas no primeiro dia de vida. Foram necropsiadas sete aves, sendo que todas essas aves

apresentaram lesões tumorais no fígado, esplenomegalia, descoloração do baço, aumento dos rins, tumores nos ovários atróficos e espessamento esbranquiçado focal da pele.

Souza (2010) apontou a ocorrência da doença de Marek entre os anos de 1999 a 2003 na região do triângulo mineiro. O autor utilizou a técnica de histopatologia como ferramenta de diagnóstico, sendo que o diagnóstico foi, então, baseado na morfologia das lesões encontradas. De um total de trezentos e sessenta e quatro frangos de corte e galinhas de postura, em cento e vinte e nove aves foi possível observar aumento de volume na bolsa e nos nervos periféricos, principalmente na região dos plexos do nervo ciático e braquial e no nervo vago, sendo que os nervos comprometidos apresentaram perda da estriação transversa e/ou coloração amarelada. Foram observados também a presença de formações nodulares de cor branca e de consistência firme no coração, fígado, rim, ovário, baço e proventrículo, lesões indicativas de neoplasias na pele ou anexos cutâneos sendo mais comuns no pescoço, coxas e região ventral. Torres et al. (2019a) (ANEXO 1) foram pioneiros no Brasil nos estudos de caracterização molecular de MDV em *Gallus gallus domesticus* da avicultura industrial e de subsistência em Minas Gerais. Através da pesquisa, foi possível observar a presença de estirpes brasileiras, as quais puderam ser classificadas desde com indicador molecular de patogenia suave, a virulentas e hipervirulentas. Esse é um dado extremamente importante, pois anterior a esse relato não havia no Brasil a caracterização molecular do MDV.

A caracterização molecular de MDV no Brasil é um estudo estratégico e de alta importância econômica, tendo em vista os indicadores de produção e o potencial impacto da doença. Segundo a ABPA (2020), as exportações de carne de frango cresceram 1,8% em relação à 2019, e ainda em agosto de 2020 as exportações apresentaram alta de 11,3%, alcançando 362,4 mil toneladas. Dessa forma perdas ocasionadas em função de infecções ocasionadas por MDV mesmo em aves vacinadas, e eventuais perdas em produtividade representariam um grande prejuízo à economia brasileira.

A permanente vigilância das estirpes de MDV quanto à sua evolução molecular, nas aves da avicultura de industrial e de subsistência, é estratégica para o Programa Nacional de Sanidade Avícola, para o melhor planejamento sanitário dos plantéis intensificados, especialmente com o avanço da avicultura comercial alternativa e orgânica.

1.7-DOENÇA DE MAREK NO MUNDO

O controle da doença de Marek através da vacinação foi um passo crucial para a viabilidade da indústria avícola moderna. No entanto, como resultado de vários fatores, surtos esporádicos ainda ocorrem em aves vacinadas por todo o mundo. Sabe-se que o MDV apresentou aumento de sua virulência nos últimos cinquenta anos, sendo que estirpes de maior virulência podem comprometer a proteção conferida pelas vacinas atualmente disponíveis (WITTER, 1997). Desta forma, relatos da ocorrência da MD, especialmente relacionados a estirpes de MDV de alta virulência, ocorrem mundialmente (LÓPEZ & OSÓRIO et al., 2017).

Segundo Atkins (2010), a doença de Marek apresenta um custo financeiro para a indústria avícola mundial estimado entre um a dois bilhões de dólares anualmente. Biggs (1965) relataram pela primeira vez a MD na Grã-Bretanha. Os experimentos pioneiros sobre vacinas no final dos anos 1960 (CHURCHILL et al., 1969), resultaram no uso sistemático da vacinação no primeiro dia de vida a partir dos anos 1970. Entretanto, a pressão seletiva da imunidade dos hospedeiros prosseguiu, e Powell e Lombardini (1986) relataram o isolamento e a caracterização de patótipos muito virulentos em aves vacinadas na Europa. Mckimm-Breschkin et al. (1990) isolaram a forma muito virulenta de MDV de aves vacinadas contra MD na Austrália. No Japão houve a caracterização de estirpes muito virulentas do MDV (IMAI et al., 1992).

Na Coreia do Sul, Sung (2002) relatou o aumento da virulência do vírus da doença de Marek, onde cinco estirpes do MDV de campo foram isoladas a partir de casos clínicos de galinhas poedeiras, assim como de frangos de corte da Coreia. Segundo o autor as estirpes de MDV foram isoladas a partir de casos onde se observou a formação de tumores, sendo que uma das estirpes quando inoculadas em galinhas SPF induziu entre dez a quinze dias pós inoculação uma grave depressão do sistema imune, além do fato de também apresentar alta incidência na formação de tumores (93,3%). A pesquisa em diferentes continentes, portanto, tem demonstrado a presença de estirpes de MDV de alta virulência.

Zhang et al. (2011) analisaram a sequência do oncogene *Meq* de estirpes de MDV predominantes na China entre os anos de 2006 a 2008. O estudo objetivou investigar a diversidade de seqüências do oncogene *Meq* do MDV isolados na China, assim como determinar as estirpes de MDV mais prevalentes no país. Foram isoladas dezenove estirpes de MDV a partir de frangos mortos ou doentes de diferentes tipos de exploração, sendo que o gene *Meq* foi sequenciado a partir de cada uma dessas estirpes.

Teng et al. (2011) realizaram uma investigação por epidemiologia molecular de MDV em Guangxi, China, com a descrição de estirpes de alta virulência, onde os isolados de campo predominantes em Guangxi foram claramente diferentes da estirpe de vacina CVI988 / Rispens, a qual têm sido utilizada há quatorze anos, sendo que a existência de diferenças entre a estirpe vacinal e as estirpes de campo podem ser uma das razões para a ocorrência de surtos mais recentes em Guangxi. Woznizkowski et al. (2011) realizaram a caracterização molecular de estirpes de MDV isoladas de galinhas vacinadas para a doença na Polônia. O autor relata que durante os anos de 2007 a 2010 foi possível isolar vinte e nove estirpes do MDV provenientes de galinhas vacinadas para a doença na Polônia, sendo que a maioria das aves apresentaram sinais clínicos característicos da doença como, por exemplo, paralisia.

Hassanin et al. (2013) realizaram a caracterização molecular, juntamente com a análise filogenética de estirpes do MDV circulantes no Egito. Segundo o autor, durante o ano de 2011, foi possível coletar amostras de galinhas vacinas que apresentavam sinais nervosos, emaciação, assim como, lesões tumorais. Cinco estirpes foram sequenciadas, sendo que a análise da sequência revelou que a maioria das seqüências estudadas apresentava uma identidade de 98% com os isolados europeus muito virulentos ATE e C12/130 e com os isolados chineses muito virulentos LMS, YA, WS03 e GX070060 MDV.

Murata et al. (2013) caracterizaram molecularmente o oncogene de *Meq* de Estirpes de MDV no Japão. Yu et al. (2013) caracterizaram molecularmente estirpes de MDV em galinhas vacinadas contra a doença na China. Segundo o autor, a análise molecular de estirpes de MDV-1 revelou uma diversidade distinta e mutações pontuais no oncogene *Meq*, o que pode contribuir para alterações nas atividades de transcrição de *Meq* e, conseqüentemente, ocasionar aumentos na oncogenicidade de MDV-1. Wajid et al., (2013) apontaram a prevalência de MDV em diferentes populações de galinhas no Iraque. Segundo

o autor foi realizado um levantamento transversal em seis províncias no sul do Iraque para determinar a prevalência pontual do vírus da doença de Marek (MDV) em diferentes populações de frangos seguido de seqüenciamento do gene *Meq* para análise filogenética. Um total de cento e nove amostras de plantéis não vacinados foram analisadas, incluindo frangos de corte comerciais e galinhas provenientes da avicultura de subsistência as quais puderam ser adquiridas nos mercados da cidade, sendo que a prevalência de MDV no total de amostras analisadas foi de 49,5%, sem diferenças significativas entre províncias. Baseado na caracterização molecular do MDV a partir do oncogene *Meq* é possível afirmar que o MDV tanto de frangos comerciais vacinados, assim como o de galinhas de subsistência não vacinadas é semelhante, visto que existe uma variação limitada da sequência do gene *Meq*.

Zhang et al. (2015) realizaram estudo das características patogênicas de estirpes do MDV prevalentes na China. Segundo os autores, em plantéis onde foi possível encontrar tumores viscerais indicativos de MD foram coletadas penas no ano de 2011 para posterior isolamento do vírus, sendo que foi possível isolar três estirpes de campo de MDV (LCC, LLY e LTS) Um grupo de aves SPF vacinadas com CVI988 e outro grupo de aves não vacinadas foram desafiados com as três estirpes no sétimo dia pós vacinação. Os isolados de MDV (LCC, LLY e LTS) induziram lesões macroscópicas em todos os frangos não vacinados (100%), sendo que nas aves não vacinadas as taxas de mortalidade induzidas pelas três estirpes foram de 42,9%, 46,7% e 23,1% sessenta dias pós-desafio, respectivamente. A vacina CVI988 induziu índices protetores de 85,7%, 92,3% e 66%, respectivamente. Estes resultados demonstram que os isolados chineses apresentam variabilidade em virulência e também que a vacina CVI988 forneceu níveis distintos de proteção contra as estirpes chinesas.

Mahmoud et al. (2016) caracterizaram a diversidade genética do *Meq* de casos clínicos da doença de Marek na Arábia Saudita. Segundo o autor, as amostras para análise foram provenientes de galinhas fundo de quintal, as quais apresentaram tumores viscerais. As sequências nucleotídicas e de aminoácidos deduzidos dos genes *Meq* amplificados dos isolados sauditas mostraram polimorfismo distinto quando comparados com os isolados virulentos padrão Md5 e GA dos EUA. Sendo que a análise filogenética revelou que os isolados de MDV da Arábia Saudita estão intimamente relacionados com estirpes de MDV da Polônia. O autor sugere ainda que aves migratórias e selvagens, bem como o comércio mundial de aves e seus subprodutos propiciam a transmissão de MDVs pelo mundo.

Segundo López-Osório et al.(2017) apesar das incubadoras colombianas implementarem um programa de vacinação intensiva contra a MD através do uso das vacinas CVI988/Rispens + HVT em frangos de um dia, as aves continuam a apresentar casos esporádicos com sintomatologia semelhante à doença de Marek (OKONKWO; EZE, 2011, WITTER et al., 1980, ZHANG et al., 2011).

Segundo OIE (2016) na forma clássica da doença de Marek, os nervos, ciático, braquial, trigêmeo e vago, são os principais afetados, sendo que as taxas de mortalidade em um rebanho raramente excedem 10-15%. Segundo López-Osório et al. (2017) foi possível observar em uma fazenda da Colômbia que a mortalidade das aves atingiu mais de 30% em cinquenta semanas, sem lesões visíveis ou linfomas viscerais graves e as lesões macroscópicas e microscópicas encontradas nas amostras de tecido (timo e nervo ciático) sugeriram a presença do MDV.

A partir desses relatos é possível verificar que MDV, inclusive de estirpes variantes, está presente na maior parte das criações avícolas do mundo. O aumento da incidência da MD em aves vacinadas têm sido observado na Argentina desde o início dos anos 90. Inicialmente a ocorrência dessa doença em aves vacinadas foi associada a administração incorreta das vacinas (BUSCAGLIA; CROSETTI, 1993). No entanto, Buscaglia (1995) associou a ocorrência da MD em aves vacinadas com quatro patotipos de MDV de alta virulência, sendo essa, a primeira descrição de estirpes muito virulentas na América latina. A informação sobre a Argentina expõe à necessidade da investigação no Brasil. A importância de MD em criações de galinhas, sejam elas intensivas ou extensivas, exige a obtenção de dados em pesquisa quanto ao estado evolutivo de MDV, nesta primeira etapa, em criações não intensificadas.

1.8-INCUBAÇÃO

A infecção citolítica inicia-se entre três e seis dias pos-infecção (p.i.), com a atrofia da bolsa cloacal e do timo em seis a oito dias p.i., e com a mortalidade precoce em oito a quatorze dias p.i. A paralisia transiente, por infecção nervosa central, ocorre entre oito e dezoito dias p.i. em infecções experimentais e seis a doze semanas de idade em condições de desafio natural. A partir do décimo quarto dia pós-infecção experimental, infiltrações de células

mononucleares podem ser encontradas nos nervos periféricos e vísceras e os sinais clínicos podem ser notados em até quatro semanas de idade. A aterosclerose necessita de três a sete meses de incubação. Em condições de campo, as poedeiras não vacinadas colocadas em ambiente de criação contaminado, desenvolvem em três a quatro semanas. Os casos clínicos mais graves ocorrem entre a oitava e nona semana de vida (WITTER; SCHAT, 2003).

1.9-DIAGNÓSTICO

O diagnóstico presuntivo da doença de Marek (MD) baseia-se na descrição dos sinais clínicos e achados patológicos. No entanto, métodos mais específicos e mais rápidos para a vigilância do vírus da doença de Marek (MDV) são necessários (MALKINSON et al., 1989). A reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem sido uma ferramenta muito valiosa para o monitoramento de MDV nas populações de aves (ABDULCAREEM et al., 2006). O exame histológico de tecidos corados com hematoxilina e eosina revela uma população mista de linfócitos pequenos e grandes, linfoblastos, plasmócitos e macrófagos em tumores. A proporção do tipo de células em tumores varia de acordo com o estágio da doença, assim como da virulência da estirpe. Células CD4+, marcador celular AV37 e MATSA são normalmente encontrados nas células tumorais presentes em animais com sinais clínicos característicos da doença de Marek (WITTER; SCHAT, 2003). O isolamento viral nas fases mais iniciais da infecção envolve a passagem cuidadosa de material contendo vírus em células infectadas em células de rim de galinha (CKC) ou fibroblastos de embrião de galinha (CEF). Outro fator importante envolvido no diagnóstico é a observação dos sinais clínicos compatíveis tanto com a forma clássica, assim como a forma aguda de manifestação da doença. Visto que, o MDV de maior virulência manifesta-se de forma aguda nas aves, a constante vigilância dos animais é algo essencial para auxiliar no diagnóstico, assim como na prevenção da MD (OIE, 2010; OSTERRIEDER et al., 2006; SANTOS; MOREIRA; DIAS, 2008; ROSS, 1998; SCHAT; NAIR, 2013; WITTER; SCHAT, 2003).

1.10-CONTROLE E PREVENÇÃO

A MD causou problemas significativos em galinhas durante a década de 1960, apresentando-se como uma enfermidade que representou um pesado fardo financeiro no cenário da indústria avícola. Durante esse período o índice de morbidade e mortalidade em poedeiras devido à MD variou de 0% a 60%, sendo que era comum haver perdas nos plantéis avícolas chegando a 30% (POWELL, 1986).

MDV (GaHV-2) possui três sorotipos diferentes, havendo estirpes representantes de cada sorotipo em vacinas. A patogenicidade está relacionada à oncogenicidade e as estirpes de vírus oncogênico de galinhas estão restritas ao sorotipo 1, com uma estirpe representante vacinal atenuada CVI-988 (Rispens) e CVI- 988C. No sorotipo 2, também de galinhas, estão estirpes naturalmente não oncogênicas, possibilitando seu uso como estirpes vacinais, por exemplo SB1 e 301-B1. No sorotipo três classifica-se um vírus isolado dos perus não oncogênico, o mais utilizado em vacinas no mundo, a estirpe HVT-FC126, MeHV-1- *Meleagrid Herpesvirus-1* (BERNARDINO, 2004; OIE, 2010; OSTERRIEDER et al., 2006; SANTOS; MOREIRA; DIAS, 2008; ROSS, 1998; SCHAT; NAIR, 2013; WITTER; SCHAT, 2003).

A primeira vacina utilizada no combate de MD foi preparada com uma estirpe atenuada (HPRS-16 – desenvolvida em *Houghton Poultry Research Station*, UK) do sorotipo 1 do MDV, seguida pelo desenvolvimento de uma vacina com amostra de herpesvírus de peru (HVT FC126), antigenicamente relacionada. A vacinação sistemática das galinhas forneceu, assim uma arma importante contra a doença, possibilitando reduzir em mais de 99% as perdas ocorridas em decorrência dessa enfermidade (OSTERRIEDER et al., 2006; WITTER; SCHAT, 2003).

A vacinação contra a doença de Marek constitui um excelente exemplo de controle bem sucedido da doença em medicina veterinária, assim como representa a primeira vacina eficaz contra câncer (NAIR, 2013). O uso das vacinas de HVT no início da década de 70 resultou em uma redução imediata nas perdas relacionadas à doença de Marek. No entanto, o êxito da vacinação com HVT na indução de proteção, principalmente baseada em interferência, exerceu pressão seletiva nas populações de MDV que podem ter acelerado o processo de

evolução para aumento de virulência (OSTERRIEDER et al., 2006; SCHAT; NAIR, 2013; WITTER, SCHAT, 2003).

A partir do diagnóstico de falhas vacinais decorrentes de aumento de virulência de MDV, e surtos em plantéis vacinados, foi desenvolvida uma vacina bivalente, contendo HVT (MeHV-1) e estirpe do sorotipo 2 (GaHV-3). Essa nova estratégia introduzida nos anos 1980 foi capaz de conter perdas correlacionadas à MD até o início e meados da década de 1990, quando as perdas aumentaram outra vez com novos surtos da doença por surgimento de estirpes ainda mais virulentas. Novamente a indústria foi forçada a adotar uma nova estratégia com a introdução de uma vacina mais eficiente, CVI988, desenvolvida a partir de um isolado natural não patogênico do sorotipo 1 do MDV (GaHV-2). Mais uma vez, essa tática tem se mostrado eficiente para o controle de perdas causadas por estirpes de alta virulência.

No entanto, a experiência pregressa nos aponta que é possível a ocorrência de maiores mudanças em virulência e, conseqüentemente, o surgimento de estirpes mais virulentas em um futuro não muito distante, visto que existem evidências de alguns isolados recentes do MDV com patogenicidade mais elevada para frangos vacinados com CVI988. Barrar os processos evolutivos do MDV será um desafio importante para o controle da MD no futuro.

A estirpe CVI988 é atualmente uma das mais eficientes na indução de proteção contra MDV, no enfrentamento do aumento da virulência do MDV, de potenciais efeitos catastróficos para a indústria avícola. A exposição ao vírus da doença de Marek ocorre precocemente, em até 3 dias de idade (WITTER; SCHAT, 2003), quando as aves estão na idade de maior suscetibilidade e os anticorpos maternos não fornecem proteção. Portanto, a vacinação deve ser utilizada para estabelecer a proteção logo após a eclosão. Por não existir tratamento para a MD, a vacinação juntamente com medidas profiláticas devidamente executadas são as principais estratégias de prevenção e controle da enfermidade.

Devido à importância econômica da doença, a Instrução Normativa Nº 56 de 4 de dezembro de 2007 do MAPA obriga, no artigo vinte e sete, a aplicação da vacina contra a doença de Marek de galinhas e frangos industriais de um dia antes da expedição. As duas principais formas de vacinação nos incubatórios são via ovo, no décimo oitavo dia embrionário ou subcutânea no primeiro dia pós-eclosão. Embora a doença de Marek seja atualmente bem

controlada através da vacinação das aves criadas de forma industrial, o aumento da virulência do vírus de campo tende a aumentar (SCHAT, 1987; WITTER, 1997).

Segundo Witter e Schat (2003) vacinas com o vírus vivo, ou seja, HVT, sorotipo 2, ou sorotipo 1 atenuado protegem contra a replicação precoce dos vírus virulentos nos órgãos linfoides e reduzem o nível de infecção latente. As vacinas não previnem a infecção ou a eliminação do MDV virulento, no entanto, evitam a formação de tumores, sendo que as vacinas inativadas induzem somente resposta de anticorpos. Embora essas vacinas estimulem níveis variáveis de proteção, não está claro se a resposta imune é direcionada contra aloantígenos expressos nas células tumorais ou contra antígenos virais. A imunidade vacinal à MD pode sofrer interferência por muitos fatores, tais como, estresse ou infecções de vírus imunossupressores como o vírus da reticuloendoteliose aviária, vírus da doença infecciosa bursal, reovírus e vírus da anemia infecciosa das galinhas, sendo isto de muita importância já que são necessários até sete dias para uma sólida imunidade estabelecida (BERNARDINO, 2004; CANAL; BARBOSA 2009; OIE, 2010; OSTERRIEDER et al., 2006; SANTOS; MOREIRA; DIAS, 2008; ROSS, 1998; SCHAT; NAIR, 2013; WITTER; SCHAT, 2003).

Da mesma forma que a eficácia das vacinas pode ser prejudicada pelo armazenamento inadequado, principalmente no caso de vacinas contendo vírus replicativo mantidas em temperaturas superiores à recomendada. Mesmo que armazenadas de modo correto, o título viral das vacinas vivas tende a reduzir devido à inativação do vírus ao longo do prazo de validade do produto. Por exemplo, as vacinas associadas às células que são utilizadas contra a doença de Marek sofrem acentuada redução do título viral durante o período de armazenamento a -20°C (CANAL; VAZ, 2012).

Dessa forma, devem ser estocadas em nitrogênio líquido e, uma vez descongeladas, devem ser aplicadas em um curto período de tempo. Mesmo em pintos vacinados as estirpes muito virulentas de MDV podem romper a proteção proporcionada pela imunização da vacina MeHV-1 e GaHV-2 devido a uma falha imunológica, a princípio causada por co-infecções com outros patógenos como o vírus da anemia infecciosa de galinha, reovírus e o vírus da doença infecciosa bursal (MILES et al., 2001, XIU-GUO et al., 2008, DONG et al., 2014, GONG et al., 2013).

Na Colômbia, a presença de DM em plantéis de aves pode ser explicada com o surgimento de novas estirpes de MDV virulentas (Witter, 1997), combinadas com o manejo inadequado de vacinas e a vacinação imperfeita (Read et al., 2015) ou co-infecção com agentes imunossupressores (Otaki et al., 1987). O mais importante a ser considerado na profilaxia da doença de Marek é a contínua evolução das estirpes de campo do MDV, sendo que essa evolução pode ser considerada um efeito direto da extensa vacinação, a qual é aplicada desde a década de 1970 (WITTER; SHARMA; FADLY, 1980; WITTER, 1997; WITTER, 2001; BUSCAGLIA; NERVI; RISSO, 2004).

Essa linha de pensamento é corroborada por Witter (1997), que sugere que a evolução das estirpes de vírus selvagem resultou na geração de estirpes de maior virulência, com casos da doença relatados em galinhas vacinadas. É muito difícil generalizar os problemas ocorridos com a MD devido às diferentes experiências entre países. Alguns relatam um eficaz controle da doença, utilizando apenas vacina liofilizada HVT livre de células; outros, no entanto, enfrentam sérios problemas de perdas apesar do uso de vacinas congeladas associadas às células, combinadas.

Existem outros fatores de manejo envolvidos além da vacinação, no entanto, infere-se que a virulência básica do vírus de campo e a prevalência da MD são bastante variáveis entre países, e até mesmo distintas entre regiões de um mesmo país, em diferentes estações do ano. Um dos principais pontos a serem observados na prevenção da MD é a limpeza e desinfecção dos galpões e equipamentos antes do alojamento do novo lote. Intervalos entre lotes sucessivos, remoção da cama, poeira e matéria orgânica, limitarão a contaminação do novo lote.

Quanto mais cedo o MDV infectar os pintinhos, maior será a incidência da doença. Portanto, as primeiras duas a três semanas de vida são as mais importantes e as aves jovens precisam ser mantidas em ambiente satisfatório, especialmente no período de desenvolvimento da imunidade. Vacinação e estratégias de controle para doenças imunossupressoras devem ser praticadas para minimizar a suscetibilidade à DM. Estresse causado por fatores de manejo ou ambientais também podem afetar a imunidade das aves vacinadas, tornando-as suscetíveis às infecções de campo (OIE, 2010; OSTERRIEDER et al., 2006; SCHAT; NAIR, 2013; WITTER; SCHAT, 2003).

CAPÍTULO 2- EVOLUÇÃO DE VIRULÊNCIA E EMERGÊNCIA DE DOENÇA DE MAREK

RESUMO

O genoma do MDV codifica mais de duzentos genes, sendo que entre esses genes, o gene *Meq*, que codifica a proteína *Meq*, tem sido associado com oncogenicidade. *Meq* é uma fosfoproteína nuclear de trezentos e trinta e nove aminoácidos, expressa nas fases de infecção lítica e de latência, sendo considerada a principal proteína oncogênica de MDV. A caracterização molecular de estirpes brasileiras de MDV revelou a presença de estirpes muito virulentas (vvMDV), tanto da avicultura industrial como de subsistência.

INTRODUÇÃO

As mudanças nas práticas de criação intensiva das aves na indústria avícola, nos últimos anos, modificaram imensamente o ambiente de criação. Até meados da década de 60, quando a produção avícola ainda era em escala extensiva, tanto os vírus como os hospedeiros eram capazes de alcançar um estado de coexistência equilibrada. No entanto, a transformação da indústria avícola nas práticas intensivas de produção no início dos anos 60 apontava uma grande mudança neste equilíbrio, em favor do vírus.

A disponibilidade contínua de grandes populações geneticamente suscetíveis capacitou o vírus para a rápida disseminação, promovendo sua evolução rápida para uma maior virulência. Isso foi evidente quando surtos de MD dizimaram plantéis de aves nos anos sessenta, eliminando grandes populações de aves ao redor o mundo. Após anos de extensiva vacinação contra MD, acumulam-se os relatos do aumento da virulência de MDV espalhados pelo mundo.

Este cenário deve-se à pressão de seleção exercida pela imunidade dos plantéis, sob extensa vacinação das aves. MDV mutantes de alta virulência poderão induzir surtos significativos nos plantéis avícolas brasileiros, visto que, as vacinas utilizadas atualmente podem não estar conferindo a proteção necessária. Sendo assim, faz-se necessária a caracterização das estirpes de MDV, visto que as pesquisas existentes sugerem o aumento da virulência de MDV no âmbito nacional, informação a qual é inexistente no país.

2.1- CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS DO VÍRUS DA DOENÇA DE MAREK

GaHV-2 (*Mardivirus*, Alphaherpesvirinae) pode ser dividido em três sorotipos: MDV-1 (RB-1B, Md5 e CVI988), MDV-2 (SB-1 e HPRS24), e o MDV-3, o qual deve mais corretamente ser chamado de herpesvírus dos perus - HVT (FC126) (HASSANIN; ABDALLAH; EL-ARABY, 2013).

Somente o MDV-1 é capaz de induzir à doença em galinhas, enquanto MDV-2 e MDV-3 são avirulentos podendo, então, ser utilizados como estirpes vacinais. De acordo com a classificação mais recente o MDV-1 é classificado como herpesvírus de galídeo tipo II (GaHV-2), já o MDV-2 como herpesvírus de galídeo tipo III e o HVT como herpesvírus de peru tipo 1 (WITTER; SCHAT, 2003). O genoma do MDV codifica mais de duzentos genes, sendo que entre esses genes, o gene *Meq*, que codifica a proteína *Meq*, tem sido associado com oncogenicidade (LUPIANI et al., 2004).

Entre os determinantes virais de oncogenicidade, a proteína *Meq* é considerada a mais importante e a mais estudada (Nair, 2013). A oncoproteína *Meq* de MDV é composta de um domínio de leucina básica N-terminal e um domínio C-terminal rico em prolina (LUPIANI et al., 2004). *Meq* é expressa abundantemente em células infectadas com MDV e em células tumorais da MD, participando como um ativador transcricional, com importante papel no processo de transformação das células pelo MDV (ROSS et al., 1997; BROWN et al., 2009). Nos últimos anos o gene *Meq* tem atraído a atenção como uma possível causa do aumento da oncogenicidade, o mais importante determinante de patogenicidade de MDV (SHAMBLIN et al., 2004; WOZNIAKOWSKI; SAMOREK-SALAMONOWICZ; KOZDRUN, 2010; TIAN et al., 2011), embora muitos outros genes também apresentem um importante papel no desenvolvimento de linfomas (JAROSINSKI et al., 2006) como, por exemplo, gene vTR (FRAGNET et al., 2003; FRAGNET et al., 2005; TRAPP et al., 2006), gebe VIL-8 e pp38. Durante a infecção por MDV, algumas células T infectadas pela forma latente do vírus sofrem transformações formando linfomas generalizados de células T em galinhas. *Meq* é uma fosfoproteína nuclear de trezentos e trinta e nove aminoácidos, expressa nas fases de

infecção lítica e de latência, sendo considerada a principal proteína oncogênica de MDV (GENNART et al., 2015).

Segundo Liu et al.(1999) e Osterrieder et al.(1999) o oncogene *Meq* interfere na expressão de fatores anti-apoptóticos celulares e em genes associados à transformação viral, assim como, liga-se aos fatores de controle do ciclo celular visando aumentar sua própria expressão. Corroborando a linha de pensamento onde *Meq* está intimamente ligado a formação de tumores, Silva et al.(2010) afirma que quando aves são infectadas com MDV onde o gene *Meq* é deletado, os tumores não se desenvolvem. Uma cópia funcional do gene *Meq* está ausente nos serotipos 2 e 3 do MDV e, assim, estas estirpes não expressam a oncoproteína após infecção, replicação ou latência (McPHERSON; DELANY, 2016).

Segundo Lee et al.(2000b) ao comparar o gene *Meq* da vacina Rispens/CV1988 atenuado com o MDV oncogênico do MDV sorotipo 1, verificou-se que uma sequência de 178 pb se inseria no genoma CV1988, o que levou a uma mutação de deslocação de quadro de um domínio de transativação dessa proteína. Em relação à latência do MDV, sabe-se que aproximadamente uma semana após a infecção, o vírus entra em uma fase latente, principalmente nas células TCD4 +, sendo que a sequência de eventos que conduzem a transição da infecção citolítica para a fase latente, não é totalmente compreendida (NAIR, 2013).

Devido a fatores ou eventos que são ainda desconhecidos, algumas das células T CD4 + latentemente infectadas em aves não vacinadas e geneticamente susceptíveis são transformadas em células neoplásicas as quais se proliferam para formar tumores em órgãos viscerais (McPHERSON; DELANY, 2016). Linfócitos e células tumorais infectados latentemente podem disseminar o vírus para diferentes locais, incluindo as células epiteliais do folículo de pena, onde ocorre uma infecção produtiva, resultando na disseminação do vírus para o ambiente (BAIGENT; DAVISON, 2004).

A reativação do MDV envolve a reincidência de uma elevada expressão do gene viral, assim como do processo de replicação do genoma viral no linfócito hospedeiro o qual se encontrava anteriormente infectado de forma latente (McPHERSON; DELANY, 2016). Durante a latência, a expressão genética indutora da replicação lítica é suprimida e a apoptose do hospedeiro é bloqueada, sendo que o oncogene de *Meq* desempenha um papel crítico na ativação de genes de transformação/latência, assim como na repressão de genes líticos (BAIGENT et al., 1998).

As relações precisas entre os estágios de latência e tumorigênese são atualmente desconhecidas (NAIR, 2013). Segundo Calnek, 2001; Robinson et al (2014) apenas alguns linfócitos TCD4+ infectados latentemente sofrem transformação, sendo que uma pequena parcela destes darão origem as linhagens de células transformadas predominantemente encontradas no linfoma da doença de Marek. Dessa forma, o questionamento sobre o que determina a mudança da infecção latente para a transformação de linfócitos T nos órgãos viscerais de aves hospedeiras suscetíveis e não vacinadas continua, sendo que as pesquisas sugerem que a integração do MDV ao genoma do hospedeiro está envolvida na tumorigênese (NAIR, 2005).

2.2- AUMENTO DA VIRULÊNCIA

A melhor compreensão das causas do aumento da virulência do MDV é necessária para controlar eficazmente este vírus. Estudos anteriores demonstraram a presença de múltiplas estirpes do vírus da doença de Marek circulando simultaneamente em diferentes plantéis de aves, levando à suposição de que as aves, individualmente, são repetidamente expostas a uma grande variedade de cepas o MDV durante sua vida (BIGGS et al., 1972; JACKSON et al., 1976).

O gene *Meq* foi identificado e caracterizado como codificador de uma oncoproteína, detectada em todas as amostras de tumor (ROSS, 1999). A partir de sua descrição original em 1907 (MAREK, 1907) até o início dos anos 1950, a doença foi descrita simplesmente como uma síndrome paralítica a qual ocorreu em uma frequência relativamente baixa, sendo caracterizada, principalmente, por inflamação dos nervos periféricos (CAMPBELL, 1956; JUNGHERR; DMOCHOWSKI, 1959; BIGGS, 1961; CAMPBELL, 1961). A apresentação clínico-patológica de MD apresentou progressivo aumento de gravidade desde a sua descrição.

Durante o final dos anos 1950 e na década de 1960 uma forma mais virulenta da Doença de Marek foi descrita por Benton; Cover (1957), a qual foi caracterizada com até 40% de mortalidade em galinhas de postura e até 10% de lesões condizentes com linfomatose visceral em frangos de corte, também descrita na Grã-Bretanha por Biggs (1965).

Biggs (1966) classificou condenações de frangos jovens ocorridas durante os cinco anos anteriores nos Estados Unidos como sendo uma forma aguda da Doença de Marek, caracterizada por lesões viscerais. Após o início da aplicação de vacinas contra a doença de Marek no início de 1970, os problemas com a ocorrência de MD em plantéis vacinados foram associados principalmente à administração incorreta das vacinas, ou devido à exposição precoce das aves ao MDV. A partir do início da década de 1970, a vacinação de pintos de um dia de idade tornou-se uma prática comum, reduzindo drasticamente as perdas econômicas associadas a MD.

No entanto, no final de 1970, surtos da doença começaram a ocorrer nos Estados Unidos mesmo em lotes vacinados com herpesvírus de perus (HVT). Desde então um certo número de patótipos muito virulentos ou variantes de vírus da MD (MDV) foram isolados a partir de várias partes do mundo (EDSON et al, 1978; EDSON; ELLIS; KLEVEN, 1981; WITTER; SHARMA; FADLY, 1980; SCHAT et al., 1981, SCHAT; CALNEK; FABRICANT, 1982; WITTER, 1983; POWELL; LOMBARDINI, 1986; MCKIMM-BRESCHKINN et al., 1990; IMAI et al.; 1992; KROSS, 1996; VENUGOPAL et al., 1996; SUNG, 2002).

Witter et al. (1980), Edson et al. (1981), Schat et al. (1982) e Witter (1982) descrevem que estirpes muito virulentas de MDV podem ser distinguidas de outros isolados patogênicos em virtude de sua oncogenicidade relativamente alta em galinhas previamente vacinadas com HVT. Com base na sua capacidade de resistir à imunidade induzida por diferentes tipos de vacinas, estirpes MDV patogênicas são classificadas como de baixa virulência (mMDV), alta virulência (vMDV), muito alta virulência (vvMDV), e altíssima virulência (vv+MDV) (WITTER, 1997), sendo todas virulentas ou mais, capazes de quebrar a proteção vacinal (WOZNIAKOWSI; SAMOREK-SALAMONOWICZ, 2014).

Isolados muito virulentos do MDV descritos por Witter (1983), causaram a doença de forma grave em galinhas vacinadas com HVT. O autor ressalta ainda que, em uma pesquisa realizada com vírus isolado de um lote vacinado contra a MD, uma forte correlação entre isolados de alta virulência e excessivas perdas por MD foi demonstrada. O aumento da incidência da MD relatada por Boer et al. (1985) e Zanella et al. (1985) em lotes vacinados

também foi observado em outras partes do mundo, incluindo Alemanha, França, países do Mediterrâneo e Japão. O aumento da incidência de MD em galinhas vacinadas foi observado também na Argentina no início da década de 1990. Problemas com a ocorrência de MD em lotes vacinados foram associados principalmente à má administração das vacinas (BUSCAGLIA; CROSETTI, 1993).

No entanto, os surtos de MD na Argentina foram associados a quatro patótipos variantes de MDV (BUSCAGLIA et al., 1995), relatando pela primeira vez estirpes de MDV de muito alta virulência (vvMDV) na América Latina. Witter (1997) sugere que o aparecimento de estirpes de maior virulência deve-se a uma forte pressão seletiva gerada pela extensa vacinação e também por uma maior resistência genética das aves comerciais. Segundo o autor, a evolução do MDV para estirpes de maior virulência, ocorre principalmente em plantéis vacinados contra MDV. A evolução contínua para maior virulência dos isolados de campo MDV tem sido descrita na Argentina, Índia e China (BUSCAGLIA et al., 2004; RAJA et al., 2009; ZHANG et al., 2011; ZHANG et al., 2012).

Segundo Zhang et al.(2011), nos últimos quinze anos, as estirpes vv+MDV foram o patótipo predominantemente isolado de galinhas vacinadas no mundo, tendo em vista que as vacinas oferecidas atualmente no mercado, não parecem gerar uma proteção vacinal adequada para essas estirpes. Segundo López-osório et al.(2017) a estirpe colombiana UDEACO-2013 isolada de um surto da MD em galinhas, relaciona-se com estirpes hipervirulentas dos Estados Unidos. Segundo os autores a estirpe colombiana apresentou os pontos 176(P/A), 217(P/A) e P233(P/L), sendo que estas substituições são condizentes com estirpes altamente virulentas. Houve também mutações que ocorreram somente na estirpe colombiana como, as posições 233(P/L) e 258 (L/S), sendo que esses pontos de mutação não foram relatados em nenhuma outra estirpe caracterizada no mundo. Foi possível encontrar substituição de aminoácidos no ponto 77(E/K), sendo esta condizente com estirpes de baixa virulência.

Yu et al. (2020) encontraram duas variantes de MDV em um mesmo animal agindo em co-infecção além do fato de que, segundo o autor, essa seria uma variante recém formada. Esses indícios corroboram a importância de estudos mais aprofundados em relação à virulência dos MDV circulantes pelo mundo e no Brasil mais especificamente. Tendo em vista que o Brasil em 2020 foi o maior exportador de carne de frango do mundo, perdas na produção em função de falhas vacinais representaria grande impacto na economia brasileira.

Como resultado da eliminação contínua e estabilidade do vírus em ambiente do aviário, presume-se que a maioria dos aviários são ricos em vírus infecciosos. Além disso, estudos anteriores sugerem que várias cepas de MDV podem ser presentes simultaneamente dentro de um rebanho.

Segundo Zhang et al.(2011) a análise molecular de estirpes de MDV isoladas na China entre 2006 a 2008 demonstrou que todos os isolados apresentavam 1020 nucleotídeos, que codificavam 339 aminoácidos. Segundo os autores, quando comparadas às sequências estudadas com as sequências de referência, doze dos dezenove isolados de MDV analisados, possuíam duas substituições de aminoácidos na posição 139 (T/A) e na posição 176 (P/R), sendo essa uma semelhança de sequência com a estirpe atenuada CVI988. Já outros seis isolados apresentavam alteração de aminoácido na posição 176 ou 177 (P/T). Sendo assim, o autor conclui que os isolados de MDV chineses constituíram um clado separado para as estirpes de referência do MDV, demonstrando que um genótipo diferente de MDV era prevalente na China durante o período amostrado. Segundo Hassanin et al.(2013) foram coletadas amostras de trinta galinhas vacinadas para MDV de quatro províncias diferentes do Egito durante o ano de 2011 . Essas amostras foram obtidas de frangos entre cinquenta e cinco e trezentos e dez dias de idade. Durante a necropsia das aves foi possível observar lesões neurais, tumores viscerais, principalmente no fígado, baço e gônadas na forma de linfomas difusos ou localizados. Dos trinta animais coletados, cinco apresentaram resultado positivo para o oncogene *Meq*, sendo essas estirpes, então, submetidas a análise filogenética do *Meq*. Os autores relatam ter encontrado substituição de aminoácidos nos isolados egípcios nas seguintes posições: 77(E/K), 80(Y/D), 88(T/A), 112(F/S), 139(A/T) e 176(R/P). As cinco sequências de aminoácidos deduzidas apresentaram elevada homologia ($\geq 98\%$) com a estirpe ATE húngara classificada como muito virulenta e também com a estirpe C12/130 do Reino Unido, classificada também como muito virulenta. Além disso, quatro sequências egípcias apresentaram alta homologia ($\geq 98\%$) para as estirpes chinesas muito virulentas LMS, YA, WS03 e GX070060.

Segundo Torres et al. (2019a), a caracterização molecular de estirpes brasileiras de MDV revelou a presença de estirpes muito virulentas (vvMDV), tanto da avicultura industrial como de subsistência. Por exemplo, a estirpe 157 (número de acesso KY322682), entre uma dezena de outras, obtida em Minas Gerais, foi agrupada com GXY2 (EF546430.1), uma estirpe da China que causou tumores agudos em plantéis vacinados com a estirpe atenuada de MDV

sorotipo 1 CVI988 (Rispens). Os estudos indicam um alerta para a avicultura brasileira, tendo em vista a proteção parcial das vacinas regularmente utilizadas no país contra estirpes de alta virulência, conforme as evidências de outros países, exigindo monitoramento das estirpes de campo e revisão das estratégias vacinais.

CAPÍTULO 3- VÍRUS DA DOENÇA DE MAREK E COINFECÇÕES: O SINERGISMO ENTRE PATÓGENOS

RESUMO

A maioria das doenças infecciosas não se manifesta isoladamente. As infecções mistas são comuns nos ambientes de criação de aves industriais e de subsistência. Considera-se que as infecções simultâneas ou coinfeções entre MDV e outros agentes endêmicos representam a condição comum na epidemiologia e mutuamente agravante das infecções em aves. Alguns agentes que ocorrem com maior frequência em avicultura são *Mycoplasma gallisepticum*, vírus da anemia infecciosa das galinhas, *Avibacterium paragallinarum*, *Chlamydia psittaci*, *Heterakis gallinarum* e *Ascaridia galli* foram detectados em nossos estudos e merecem revisão sobre sua relevância.

INTRODUÇÃO

A imunodepressão é uma importante consequência associada à MD, especialmente em aves jovens. Diversos agentes etiológicos e parasitos mostram-se responsáveis pelo aumento na capacidade do MDV em se estabelecer e causar a doença no organismo.

Considerando a genética e o perfil sanitário, as linhagens de galinhas caipiras diferem amplamente das criações industriais. Os parâmetros produtivos são mais baixos, apesar de serem obtidos com custos mínimos e de fundamental importância social. Estas criações não possuem controle sanitário efetivo, comumente há deficiência nutricional e não sofrem intervenções reprodutivas. São caracterizadas por uma população geralmente pequena, contendo cerca de cinco a vinte aves por propriedade, de várias faixas etárias e diferentes gerações em convívio. O convívio de aves em diferentes idades proporciona o ambiente ideal para a perpetuação de diversos agentes e parasitos no meio ambiente, tendo em vista que a maturidade o sistema imune das aves mais velhas proporciona uma maior estabilidade do organismo e mesmo o animal estando infectado é possível não manifestar sinais clínicos ao mesmo tempo que está eliminando esses agentes no ambiente o qual habita. Vacinas são raramente empregadas, permitindo a condição de infecção natural, com oportunidade de

multiplicidade de infecções por organismos patogênicos. A subnutrição, muitas vezes relacionada à falta de diversos nutrientes essenciais, pode contribuir para a susceptibilidade e imunodepressão, especialmente para microrganismos oportunistas. Em Minas Gerais, o vírus da anemia das galinhas (CAV) foi detectado em galinhas da avicultura familiar em índice médio de 30% das aves (BARRIOS et al., 2009), indicando que CAV pode ter um papel na susceptibilidade destes plantéis. Da mesma forma, *Ascaris galli* é rotineiramente encontrado na avicultura familiar. Entretanto, embora frangos de corte sejam criados em sistemas intensivos de criação, em galpões com graus diferentes de biosegurança, devem ser monitorados para endoparasitos, e outros patógenos, tendo em vista que são usualmente desafiados por MDV e CAV (TORRES et al., 2019b). A coinfeção pode, ainda, também beneficiar aspectos de virulência de MDV (KE et al., 2015; PEREZ-LOSADA et al., 2015).

3.1- O PAPEL DAS COINFEÇÕES EM ANIMAIS INFECTADOS POR MDV

Segundo Yu et al. (2020), a coinfeção pode levar à evolução da cepa e pode exacerbar a carga e gravidade da doença no organismo animal. Infecções por MDV e CAV causam perdas econômicas mais evidentes em aves de produção. No entanto, ocorrem também em aves fundo de quintal, causando infecções simples ou coinfeção (AHMED et al., 2016). Agentes oportunistas obtêm vantagens em coinfeções (DAVIDSON; RAIBSHTEIN; ALTOURI, 2013), incluindo diversas helmintoses, tumores por outras etiologias, como por retrovírus, e especialmente as coccidioses por *Eimeria* spp. (BIGGS et al., 1969), ocasionando ainda maior perturbação ao crescimento. A presença de coinfeção de MDV e CAV já foi demonstrada em vários estudos (MILES; REDDY; MORGAN, 2001; HARIDY et al., 2009; HARIDY et al., 2012). Co-infecções entre CAV e o vírus da doença de Marek ou vírus da doença bursal infecciosa (IBDV) pode levar a uma doença mais complexa e grave (IMAI et al., 1999; SCHAT, 2009). Durante graves surtos de MD no Japão, EUA, Holanda, Itália, Alemanha e Israel, foi possível recuperar CAV, apesar de todas as aves terem sido vacinadas contra MDV (OTAKI et al., 1987; DE BOER et al., 1989).

WINTER, 2001; ZANELLA et al., 2001; DAVIDSON et al., 2004). Foi possível detectar mortalidade precoce de galinhas devido à coinfeção de MDV e CAV durante as duas primeiras semanas de vida dos animais (VON BÜLOW et al., 1983; OTAKI et al., 1987;

GORYO; OKADA, 1994; ZANELLA et al., 2001). Segundo Haridy et al. (2009), CAV potencializa a mortalidade induzida pelo MDV, pois há indução da imunodepressão.

Certas células infectadas por micoplasmas não morrem, mas ficam estressadas, sendo, portanto, mais sensíveis a agentes infecciosos secundários, fator esse que pode interferir no diagnóstico clínico (TIMENETSKY, 2009). Desta forma, um quadro de coinfeção entre MDV e MG pode torna-se algo extremamente danoso para o organismo da ave afetada por ambos. Se o desafio gerado pelos agentes infecciosos for extremo, considerando o poder de virulência dos microrganismos envolvidos, o sistema imunológico do animal pode vir a entrar em colapso, fazendo com que a resposta imune seja ineficaz frente ao desafio.

Considerando que os agentes infecciosos não se apresentam isoladamente no organismo do animal desafiado, o quadro decorrente de infecções simultâneas é por si só um desafio extremo para a ave, principalmente quando associados aos fatores estressantes da intensificação, como estresse, superlotação, competição social, canibalismo, má nutrição, desconforto térmico e inadequado bem-estar, fazendo com que o sistema imune da ave afetada não consiga debelar a infecção.

A coriza infecciosa (CI) é uma doença respiratória aguda, subaguda ou crônica, altamente contagiosa, que afeta principalmente o trato respiratório superior de galinhas (*Gallus gallus domesticus*), mas pode vir a acometer, mais raramente, codornas, faisões e galinha d'Angola (BYARUGABA et al., 2006). É uma doença de distribuição mundial, tendo maior importância nas regiões de climas temperados a tropicais. Estresse e presença de patógenos concomitantes têm sido observados em surtos de CI como prováveis potencializadores da doença. Contextualizando o sistema de produção no qual a ave está inserida, pode-se considerar que as infecções concomitantes (COUTO et al., 2016) são as principais causas de morte em planteis afetados, visto que a maioria dos agentes infecciosos não se manifesta de maneira isolada. Desta forma, quando o animal é tratado somente para uma enfermidade, o médico veterinário acaba abrindo portas para outra patologia, a qual inicialmente poderia apresentar-se de forma menos agressiva e patogênica.

Segundo Torres (2017), foram encontradas co-infecções entre MDV e diversos agentes infecciosos e parasitários presentes na avicultura industrial e de subsistência (artigo em anexos). Empregando a técnica de PCR, foi possível a detecção de 63,4% de positividade em galinhas de subsistência e em 39,3% de frangos da avicultura industrial, para a presença do oncogene *Meq*. Nas galinhas caipiras, MDV foi detectado em coinfeção com *Mycoplasma gallisepticum* (Mg, gene *mgc2*) em 49% dos animais amostrados, com *Avibacterium paragallinarum* (Ap, gene *hpg-2*) em 20,5%, com *Chlamydia psittaci* (Cp, gene *ompA*) em 16% e com o vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV, gene *vp1*) em duas aves (1,8%). Infecções triplas, MDV-Mg-Cp (10,7%), MDV-Mg-Ap (9%), MDV-Ap- Cp (0,9%) ou um animal com detecção quádrupla de MDV-Mg-CAV-Cp, também foram encontrados. Nos frangos industriais, a coinfeção MDV-Mg foi detectada em 17,8% das amostras, MDV-Ap em 10,7% e MDV-Mg-Ap em 7% dos animais amostrados.

Estes relatos reforçam a hipótese da co-infecção como regra e salientam a importância de uma visão mais ampla sobre a diversidade de desafios envolvidos.

OBJETIVOS

- Geral

Detectar, sequenciar e analisar filogeneticamente o oncogene *meq* de estirpes de MDV em galinhas da avicultura industrial e de subsistência.

- Específicos

- Empregar a PCR, com oligonucleotídeos que falqueiam *meq*, para detecção de MDV, utilizando como molde o DNA extraído de baço, bursa de Fabricius, medula óssea, nervos e plexos braquial, ciático e vago, pele e timo das aves necropsiadas;

- Pesquisar, com foco no gene *meq*, MDV em galinhas da avicultura de subsistência provenientes da rotina laboratorial do Setor de Doenças das Aves da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais;

- Pesquisar, com foco no gene *meq*, MDV em galinhas e frangos da avicultura industrial em Minas Gerais;

- - Empregar a PCR para a detecção de *meq* em latência no gânglio do nervo trigêmeo;

- Avaliar co-infecções nas aves positivas para o MDV, utilizando protocolos de PCR específicos para *Mycoplasma gallisepticum*, *Avibacterium paragallinarum*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Chlamydia psittaci*, *Mycobacterium avium avium*, *Avipoxvirus* e vírus da anemia infecciosa das galinhas.

- Realizar sequenciamento genético dos produtos de *meq*;

CAPÍTULO 4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AVES

Foram avaliadas galinhas de postura e frangos de corte, de diferentes idades, da avicultura industrial e aves da avicultura familiar, de Belo Horizonte e região metropolitana e interior do Estado de Minas Gerais, provenientes da casuística da rotina de diagnósticos do Laboratório de Doenças das Aves (LabAves) (Escola de Veterinária, UFMG).

4.2 COLETA DE AMOSTRAS

Amostras teciduais foram recolhidas de tecidos de aves necropsiadas na rotina e pesquisa do LabAves (Tab. 1).

Tabela 1: Amostras de tecidos examinados.

Materiais coletados das aves necropsiadas			
Pele	Pulmões	Nervo vago	Bursa de Fabricius
Pena	Fígado	Nervo ciático	Tonsilas cecais
Timo	Bile	Plexo Braquial	Cornetos nasais
Baço	Coração	Nervo trigêmeo	Encéfalo
Traqueia	Medula óssea	Rins	

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA dos tecidos foi realizada pelo método de sílica e iodeto de sódio, seguindo o protocolo de Boom *et al.* (1990) com as seguintes modificações: a extração foi executada por meio da reação do material bruto previamente macerado (200µL), com aproximadamente 700 µL de iodeto de sódio (NaI) a 6M, sob aquecimento a 55° C e forte homogeneização em vórtex a cada cinco minutos, durante 15min. O material obtido foi submetido à centrifugação por três minutos a 3500 rpm e a parte líquida coletada com o auxílio de uma pipeta e colocada em um novo tubo. Junto com 40 µL de suspensão de sílica, a nova mistura foi homogeneizada com o auxílio de um vórtex. A mistura foi incubada em agitador *end-over-end* (Cel-Gro, Lab-Line, IL, USA) por quinze minutos a temperatura

ambiente. Após centrifugação por 90 segundos a 13500 rpm, o sobrenadante descartado por inversão do microtubo.

O sedimento (DNA ligado à sílica) foi lavado duas vezes com 1 mL de tampão de lavagem (Etanol 60%, 50mM Tris-HCl pH8,0, 10mM EDTA pH 8,0). Após centrifugação por 30 segundos a 13500 rpm, todo o tampão de lavagem foi descartado. Sendo adicionado 1 mL de acetona e após homogeneização no vórtex e centrifugação por 60 segundos a 13500 rpm, o sobrenadante sendo descartado e o resíduo de acetona evaporado do sedimento em tubo com tampa aberta, mantido a 55°C por 20 minutos. O DNA aderido à sílica foi eluído por adição de 80 µL de TE 1X (5 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA pH 8,0), levemente homogeneizado e incubado a 55°C por 15 minutos, sendo que, a seguir, o microtubo foi centrifugado por dois minutos a 13500 rpm, para solidificar o sedimento. O sobrenadante foi removido com o auxílio de uma pipeta, tendo-se o cuidado de não misturar a sílica novamente, que determinará a necessidade de novas centrifugações para eliminá-la totalmente das amostras. Após centrifugação e coleta do DNA, as amostras foram estocadas em freezer a -20°C. A quantidade e a pureza do DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro NanoVue® (GE, Healthcare, Reino Unido) a 260nm, 280nm e sua razão.

4.4 OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Para a realização do PCR diagnóstico para o vírus da doença de Marek foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores previamente descritos (MURATA *et al.*, 2013), pois há a amplificação do L-meq (763 bp), assim como a oncoproteína Meq (583bp), diferenciando-se, assim, as amostras vacinais das amostras patogênicas de campo. O diagnóstico de *C. psittaci* através da PCR foi desenvolvido através do DNA total extraído das amostras de campo o qual foi empregado como molde para a amplificação de parte do genoma de *C. psittaci*. Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores descritos por Sachse *et al.* (2009a) que amplificam um produto de 418 pares de base, sendo que o gene ompA possibilita maior especificidade e menor sensibilidade por ter menor número de cópias no organismo (ANDERSEN E FRANSON, 2007). As reações para vírus da doença de Marek (MDV), vírus da anemia infecciosa das galinhas, *Mycoplasma gallisepticum*, *Chlamydia*

psittaci, *Avibacterium paragallinarum* foram desenvolvidas utilizando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores a serem utilizados para amplificação dos microrganismos que serão pesquisados: Vírus da doença de Marek, Vírus da anemia infecciosa das galinhas, *Mycoplasma gallisepticum*, *Chlamydia psittaci*, *Avibacterium paragallinarum*.

Agente etiológico	Gene	Primer senso	Primer consenso	Segmento (pb)	Referência
Vírus da Doença de Marek	MDV <i>meq</i>	5' TGTTGCGGATCCT CGGTAAGA-3'	5'- AGTTGGCTTGT CATGAGCCAG- 3'	583 - 763	Murata <i>et al.</i> , 2013
Vírus da Anemia Infecciosa das galinhas	CAV VP1	5'- GACTGTTAAGATG GCAAGACGAGCT- 3'	5'- GGCTGAAGGA TCCCTCCATTC -3'	692	Todd <i>et al.</i> , 1992
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	MG 16s	5'GAGCTAATCTGT AAAGTTGGTC 3'	5' GCTTCCTTGCG GTTAGCAAC 3'	186	OIE, 2008
<i>Chlamydia psittaci</i>	CP Omp-A	5'- ACTACGGAGATTATG TTTTTCGATCGTGT-3'	5'- CGTGCACCTACG CTCCAAGA-3'	400	Sachse <i>et al.</i> , 2009 a
<i>Avibacterium paragallinarum</i>	AP HPG-2	5'- TGAGGGTAGTCTT GCACGCGAAT-3'	5'- CAAGGTATCG ATCGTCTCTCT ACT-3'	500	Chen <i>et al.</i> , 1996

4.5 CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS ANALISADOS

Para avaliar a presença de agentes infecciosos atuando em co-infecção com MDV serão aplicadas reações em cadeia da polimerase (Tabela 3).

Tabela 3: Condições de PCR para o vírus da doença de Marek, vírus da anemia infecciosa das galinhas, *Mycoplasma gallisepticum*, *Chlamydia psittaci*, *Avibacterium paragallinarum*.

Agente Etiológico	Pré-mix	Condições de amplificação
Vírus da doença de Marek	200ng de DNA, Tampão 5X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl), 1µl de dNTPmix a 10mM, 1,5mM de MgCl ₂ , 1µl de cada iniciador externo a 10 pmol, 1UI de Taq Polimerase (PlatinumTaq DNA Polymerase – Invitrogen) e água ultra pura 18,2 MΩ q.s.p Volume final: 50µL	Fase inicial a 94°C por 1 min, seguida por 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 57°C por 60 s e 72°C por 90 s, com uma fase de extensão final de 7 minutos a 75°C.
Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas	200ng de DNA, tampão 1X (Tris-HCl 200 mM pH 8,4, KCl-Invitrogen 200 mM, 0,2 mM de dNTPmix (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl ₂ 25 mM (Invitrogen), 10 mM de cada iniciador, 1UI de Taq Polymerase (Platinum Taq DNA Polymerase - Invitrogen) e água ultrapura (18,2 MΩ) qs para um volume final de 50 µL.	Fase inicial a 94°C por 1 min, seguida por 42 ciclos de 94°C por 1 minuto, 57°C por 60 s e 72°C por 90 s, com uma fase de extensão final de 10 minutos a 75°C.
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	200 ng de DNA, tampão 1X (Tris-HCl 200 mM pH 8,4, 500 mM KCl - Invitrogen), 0,2 mM de dNTPmix (Invitrogen), 2 mM de MgCl ₂ 25 mM (Invitrogen), 10 mM de µL de cada iniciador, 1UI de Taq Polimerase (Platinum Taq DNA Polymerase - Invitrogen) e água ultrapura (18,2 MΩ) qs para um volume final de 50 µL.	Desnaturação inicial de 1 minuto a 94°C, seguidos de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C da fase de desnaturação, 30 segundos a 55°C correspondente a fase de anelamento e 1 minuto a 72°C na fase de extensão. Em seguida, o produto da amplificação será submetido à etapa de extensão final por 5 minutos a 72°C.
<i>Chlamydia psittaci</i>	200 ng de DNA, tampão 1X (Tris-HCl 200 mM pH 8,4, 500 ml de KCl - Invitrogen), 02 mM de dNTPmix-Invitrogen), 3 mM de deMg Cl ₂ 25 mM (Invitrogen), 10 mM de cada iniciador, 1UI de Taq Polimerase (Platinum Taq DNA Polymerase - Invitrogen) e água ultrapura (18,2 MΩ) qs para um volume final de 23,5µL.	Desnaturação inicial de 4 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C da fase de desnaturação, 1 minuto a 51°C da fase de anelamento e 30 segundos a 72°C correspondente a fase de extensão. Em seguida, o produto da amplificação será submetido à etapa de extensão final por 7 minutos a 72°C.
<i>Avibacterium paragallinarum</i>	200 ng de DNA, tampão 1X (Tris-HCl 200 mM pH8,4, KCl-Invitrogen), 0,1 mM de dNTPmix (Invitrogen), 4 mM de MgCl ₂ 25mM (Invitrogen), 10mm de cada iniciador, 1UI de Taq Polimerase (Platinum Taq DNA Polymerase - Invitrogen) e água ultrapura (18,2 MΩ) qs para um volume final de 25 µL.	Desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguidos de 40 ciclos de 45 segundos a 94°C da fase de desnaturação, 1 minuto a 65°C da fase de anelamento e 45 segundos a 72°C correspondente a fase de extensão. Em seguida, o produto da amplificação será submetido à etapa de extensão final por 7 minutos a 72°C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, M. S.; ONO, H.; SASAKI, J.; OCHIAI, K.; GORYO, M. Persistence of chicken anemia virus antigen and inclusions in spontaneous cases of Marek's disease visceral lymphomas in broiler chickens at slaughter houses. Journal of Veterinary Medical Science, 2016.

- ANDERSEN, A. A.; FRANSON, J. C. Avian Chlamydiosis. In: THOMAS N. J.; HUNTER D. B.; ATKINSON C. T. (Ed.). *Infect. Diseases Wild Birds*. Oxford: Blackwell Publishing, Cap. 15, p. 303–316, 2007.
- BACK, A. *Manual de doenças de aves*. Cascavel: Editora Coluna Saber, p. 100-110, 2004.
- BAIGENT, S.J.; KGOSANA, L.B.; GAMAWA, A.A. Relationship between levels of very virulent MDV in poultry dust and in feather tips from vaccinated chickens. *Avian Diseases*, v.57, p. 440-447, 2013.
- BARRIOS, P. R.; MARÍN, S. Y.; RESENDE, M.; RIOS, R. L.; RESENDE, J. S.; HORTA, R. S. COSTA, M. P.; MARTINS, N. R. S. Occurrence of chicken anemia virus in backyard chickens of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Ciências Avícolas*, v. 11, n. 2, p. 135-138, 2009.
- BERNARDINO, A. Programas de vacinação. In: MENDES, A. A.; NÄÄS, I. A.; MACARI, M. *Produção de Frangos de Corte*. 1ª edição. Editora FACTA. Campinas, p 179-202, 2004.
- BIGGS, P.M. A discussion on the classification of the avian leucosis complex and fowl paralysis. *British Veterinary Journal*, v.117, p.326–334, 1961.
- BIGGS, P. M.; PAYNE, L.N. Transmission experiments with Marek's disease (fowl paralysis). *Veterinary Record*, v.75, p.177–179, 1963.
- BIGGS, P.M. Avian transmissible tumours. *Proc 3rd Congress of the World Veterinary Poultry Association*, p.61-67, 1965.
- BIGGS, P. M.; PAYNE, L.N. Studies on Marek's disease. I. Experimental transmission. *Journal of the National Cancer Institute*, v.39, p.267–280, 1967.
- BIGGS, P. M.; CHURCHILL, A.E.; ROOTES, D.G.; CHUBB, R.C. The etiology of Marek's disease-an oncogenic herpes-type virus. *Perspective in Virology*, v.6, p.211–237, 1968.
- BIGGS, P.M. Marek's Disease. *The history and Biology of Marek's Disease Virus*. p.2, 2000.
- BLUME, G. R.; CARDOSO, S. P.; OLIVEIRA, M. L. B.; MATIOLLI, M. P.; GÓMEZ, S. Y. M.; REIS JÚNIOR, J. L.; MARTINS, N. R. S. Visceral Marek's disease in white-peafowl (*Pavo cristatus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.68(6), p.1602-1608, 2016.
- BOER, D.G.F.; GROENENDAL, J.E.; OEI, H.L.; POL, J.M.A. *International Symposium on Marek's disease*. Eds B.W. Calnek and J.L.Spencer. Pennsylvania. American Association of Avian Pathologists, p.531, 1985.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal Clinical Microbiology*, v. 37, p. 615– 619, 1990.

BROWN, A.C.; SMITH, L.P.; KGOSANA, L.; BAIGENT, S.J.; NAIR, V.; ALLDAY1, M.J.

Homodimerization of the Meq Viral Oncoprotein Is Necessary for Induction of T-Cell Lymphoma by Marek's Disease Virus. *Journal of Virology*, v.83, n.21, p.11142-11151, 2009.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, gabinete do ministro, instrução normativa nº 56, de 4 de dezembro de 2007.

BUSCAGLIA, C.; NERVI, P.; GARBI, J.L.; PISCOPO, M. Isolation of very virulent strains of Marek's disease virus from vaccinated chickens in Argentina. *Proceedings of the 44th Western Poultry Disease Conference*. Sacramento, CA, USA, p.53-57, 1995.

BUSCAGLIA, C., NERVI, P.; RISSO, M. Characterization of four very virulent Argentinian strains of Marek's disease virus and the influence of one of those isolated on synergism between Marek's disease vaccine viruses. *Avian Pathology*, v.33, p.190-195, 2004.

BYARUGABA, D. K.; MINGA, U. M.; GWAKISA, P. S.; KATUNGUKA, E. R.; BISGAARD, M. S.; OLSE, J. E. Occurrence, isolation and characterisation of *Avibacterium paragallinarum* from poultry in Uganda. *Proc. 11th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics. Avian Diseases*, v.51, p.534-539, 2006.

CALNEK, B. W.; HITCHNER, S.B. Localization of viral antigen in chickens infected with Marek's disease herpesvirus. *Journal of the National Cancer Institute*, v.43, p. 935-949, 1969.

CALNEK, B.W.; ALDINGER, H.K.; KAHN, D.E. Feather follicle epithelium: A source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian Diseases*, v.14, p.219, 1970a.

CALNEK, B. W.; UBERTINI, T.; ADLDINGER, H.K. Viral antigen, virus particles, and infectivity of tissues from chickens with Marek's disease. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 45, p.341-351, 1970b.

CALNEK, B. W. Established cell lines of avian lymphocytes and their use. In A. Toivanen and P. Toivanen (eds.). *Avian Immunology: Basis and Practice Vol. II*. CRC Press: Boca Raton, FL, p. 57-70, 1987.

CALNEK B.W.; WITTER R.L. Marek's disease. In *Diseases of poultry*, 10th Ed. (Calnek, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; MCDUGALD, L.R.; SAIF, Y.M. eds). Iowa State University Press, Ames, p.369-413, 1997.

CAMPBELL, J.G. Leucosis and fowl paralysis compared and contrasted. *Veterinary Research*, v.38, p.527-529, 1956.

CAMPBELL, J.G. A proposed classification of the leucosis complex and fowl paralysis. *British Veterinary Journal*, v.117, p.316-325, 1961.

CANAL, C.W.; BARBOSA, T.M.C. Enfermidade de Marek, Complexo Leucótico Aviário e Reticuloendoteliose. In: *Doenças das Aves*, p.570, 2009.

- CANAL, C.W.; VAZ, C.S.L. Vacinas víricas. In: *Virologia Veterinária*. Ed. UFSM, Santa Maria, 2012.
- CHEN, X.; MIFLIN, J. K.; ZANG, P.; BLACKALL, P. J. Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Diseases*, v.40(2), p.398-407, 1996.
- CHURCHILL, A. E.; BIGGS, P.M. Agent of Marek's disease in tissue culture. *Nature*, v.215, p.528-530, 1967.
- CHURCHILL, A. E.; PAYNE, L. N.; CHUBB, R. C. Immunization against Marek's disease using a live attenuated virus. *Nature*, v. 221, p.744-747, 1969.
- COUTO, R. M.; BRAGA, J. F. V.; GOMES, S. Y. M.; RESENDE, M.; MARTINS, N. R. S.; ECCO, R. Natural concurrent infections associated with infectious laryngotracheitis in layer chickens. *The Journal of Applied Poultry Research*, v.25, p.113-128, 2016.
- DAVIDSON, I.; KEDEM, M.; BOROCHOVITZ, H.; KASS, N.; AYALI, G.; HAMZANI, E. Chicken infectious anemia virus infection in Israeli commercial flocks: virus amplification, clinical signs, performance, and antibody status. *Avian Diseases*, v.48, p.108-118, 2004.
- DAVIDSON, I.; RAIBSHEIN, I.; AL-TOURI, A. Quantitation of Marek's disease and chicken anemia viruses in organs of experimentally infected chickens and commercial chickens by multiplex real-time PCR. *Avian Diseases*, v.57, p.532-538, 2013.
- DE BOER, G.F.; JEUNSEEN, S.H.M.; VAN ROOZELAAR, D.J.; Vos, G.J.; Koch, G. Enhancing effect of chicken anemia agent (CAA) on Marek's disease pathogenesis. In *Proceedings of the 38th Western Poultry Disease Conference*, Tempe, AZ (p. 28). Provo, UT: Brigham Young University, 1989.
- EDSON, C.S., PAGE, R.K.; KLEVEN, S.H. Effectiveness of cell-free and cell-associated turkey herpesvirus vaccine against Marek's disease in chickens as influenced by maternal antibody, vaccine dose, and time of exposure to Marek's disease virus. *Avian Diseases*, v.22, p. 583-597, 1978.
- EDSON, C.S.; ELLIS, M.N.; KLEVEN, S.H. *Poultry Science*, v.60, p.317, 1981
- FEHLER, F.; WINTER, C. CAV infection in older chickens, na apathogenic infection? In *Proceedings of the 2nd International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia*. Giessen, Germany: Institute fur Geflugelkrankheiten, Justus Liebig University, p.391-394, 2001.
- FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M.; VARELA, A.P.M.; *Herpesviridae*. *Virologia Veterinária*, 2ª edição, Editora da UFSM, Santa Maria, p. 503- 570, 2012.
- GENNART, I.; COUPEAU, D.; PEJAKOVIC, S.; LAURENT, S.; RASSCHAERT, D.; MUYLKENS, B.

Marek's disease: Genetic regulation of gallid herpesvirus 2 infection and latency. *The Veterinary Journal*, v.205, p.339-348, 2015.

GIMENO, I. Doença de Marek. In: REVOLLEDO, L; FERREIRA, A. *Patologia Aviária*. Barueri, SP: Manole, 2009.

GORYO, M.; OKADA, K. Histopathology in chicks dually inoculated with chicken anemia virus and Marek's disease virus at various ages. In *International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia*. Rauschholzhausen, Germany.p.392-405, 1994.

HARIDY, M.; GORYO, M.; SASAKI, J.; OKADA, K. Pathological and immunohistochemical study of chickens with coinfection of Marek's disease virus and chicken anaemia virus. *Avian Pathology*, v. 38, p.469– 483, 2009

HARIDY, M.; SASAKI, J.; OKADA, K.; GORYO, M. Persistence of inclusions and antigens of chicken anemia virus in Marek's disease lymphoma. *Reserch in Veterinary Science*, v.93, p.1353-1360, 2012.

HASSANIN, O.; ABDALLAH, F.; EL-ARABY, I. E. Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Marek's Disease Virus from Clinical Cases of Marek's Disease in Egypt. *Avian diseases*, v. 57, p. 555-561, 2013.

HEIDARI, M.; SARSON, A. J.; HUEBNER, M.; SHARIF, S.; KIREEV, D.; ZHOU, H. Marek's disease virus– induced immunosuppression: array analysis of chicken immune response gene expression profiling. *Viral immunology*, v.23, p.309-319, 2010.

IMAI, K.; YUASA, N.; IWAKIRI, H.; NAKAMURA, K.; HIHARA, H.; ISNITA, T.; INAMOTO, A.; OKARNOTO, I.; OHTA, K.; MAEDA, M. Characterization of very virulent Marek's disease virus isolated in Japan. *Avian Pathology*, v.21, p.119-126, 1992.

JAROSINSKI, K.W.; TISCHER, B.K.; TRAPP, S.; OSTERRIEDER, N. Marek's diseases vírus: lytic replication, oncogenesis and control. *Expert Ver. Vaccines*, v.5, 2006.

JONES, D.; LEE, L.F.; LIU, J.L.; KUNG, H.J.; TILLOTSON, J.K. Marek disease virus encodes a basic- Leucine zipper gene resembling the fos/jun oncogenes that is highly expressed in lymphoblastoid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.89, p.4042–4046, 1992b.

JUNGHERR, E.; DMOCHOWSKI, L. The Avian Leukosis Complex. In BIESTER, H.E.; SCHWARTE, L.H. (ed.), *Diseases of Poultry*, 4 ed. Iowa State University Press, Ames, p..393-442, 1959.

KROSS, I. Isolation of highly lytic serotype 1 Marek's disease viruses from recent field outbreaks in Europe. In SILVA, R.F.; CHENG, H.H.; COUSSENS, P.M.; LEE, L.F.;VELICER, L.F. (Eds.), *Current Research on Marek's Disease*. Proceedings of the 5th International Symposium on Marek's Disease (pp. 119 _/124). Kellogg Center, Michigan State University, East Lansing, MI, USA, 1996.

LANDMAN, W. J.; VERSCHUREN, S.B. Titration of Marek's disease cell-associated vaccine virus (CVI 988) of reconstituted vaccine and vaccine ampoules from Dutch hatcheries. *Avian Diseases*, v.47, p.1458– 1465, 2003.

LIU, J.L.; KUNG, H.J. Marek's disease herpesvirus transforming protein MEQ: a c-Jun analogue with an alternative life style. *Virus Genes*, v.21, p.51–64, 2000.

LUPIANI, B.; LEE, L.F.; CUI, X.; GIMENO, I.; ANDERSON, A.; MORGAN, R.W.; SILVA, R.F.; WITTER, R.L.; KUNG, H.J.; REDDY, S.M. Marek's disease virus-encoded Meq gene is involved in transformation of lymphocytes but is dispensable for replication. *PNAS*, v.101, n.32, p.11815-11820, 2004.

MAHMOUD, H.A.M.; IBRAHIM, M.E.S.; MALIK, A.A.H.; YOUSEF, M.A.H. Diversity of Meq gene from , clinical Marek's disease virus infection in Saudi Arabia. *Veterinary World*, v.9, p.572-578, 2016.

MALKINSON, M.; DAVIDSON, I.; STRENGER, C.; WEISMAN, Y.; MARAY, T.; LEVY, H.; BECKER, Y. Kinetics of the appearance of Marek's disease virus DNA and antigens in the feathers of chickens. *Avian Pathology*, v.18, p.735-744, 1989.

MAREK, J. Multiple Nervenentzündung (Polyneuritis) bei Hühnern. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr*, v.15, p.417-421, 1907.

MILES, A. M.; REDDY, S. M.; MORGAN, R. W. Coinfection of specific-pathogen-free chickens with Marek's disease virus (MDV) and chicken infectious anemia virus: effect of MDV pathotype. *Avian Diseases*, v.45, p. 9–18, 2001.

MURATA, S.; HASHIGUCHI, T.; HAYASHI, Y.; YAMAMOTO, Y.; MATSUYAMA-KATO, Y.; TAKASAKI, S.; ISEZAKI, M.; ONUMA, M.; KONNAI, S.; OHASHI, K. Characterization of Meq proteins from field isolates of Marek's disease virus in Japan. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 16, p. 137-143, 2013

NAIR, V. Evolution of Marek's disease- A paradigm for incessant race between the pathogen and the host. *Veterinary Journal*, v.170, p.175– 183, 2005.

NAZERIAN, K.; SOLOMON, J.J.; WITTER, R.L.; BURMESTER, B.R. Studies on etiology of Marek's disease. II. Finding of a herpesvirus in cell culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v.127, p.177-182, 1968.

OIE- Office International des Epiooties. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 6. ed. Paris, 2008.

OIE- Office International des Epizooties. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 6. ed. Paris, 2010.

OSTERRIEDER, N.; KAMIL, J.P.; SCHUMACHER, D.; TISCHER, K.; TRAPP, S. Marek's disease virus: from miasma to model. *Nature*, v.4, p.283-294, 2006.

OTAKI, Y., NUNOYA, T., TAJIMA, M. & NOMURA, Y. Isolation of chicken anaemia agent and Marek's disease virus from chickens vaccinated with turkey herpesvirus and lesions induced in chicks by inoculating both agents. *Avian Pathology*, v.16, p.291-306, 1987.

PAPPENHEIMER, A.M.; DUNN, L.C.; CONE, V. A study of fowl paralysis (neuro-lymphomatosis gallinarum). *Storrs Agricultural Experiment Station*, v.143, p.186-190, 1926.

PAYNE, L. N.; VENUGOPAL, K. Neoplastic diseases: Marek's disease, avian leukosis and reticuloendotheliosis. *International Office of Epizootics*, v.19, p. 544-564, 2000.

POWELL, P.C.; LOMBARDINI, F. Marek's disease: a worldwide problem. *World's Poultry Science*, v.42, p.205-218, 1986.

PURCHASE, H. G.; BIGGS, P.M. Characterization of five isolates of Marek's disease. *Research in Veterinary Science*, v.8, p.440-449, 1967.

RAJA, A.; DHINAKAR, R.G.; BHUVANESWARI, P.; BALACHANDRAN, C.; KUMANAN, K. Detection of virulent Marek's disease virus in poultry in India. *Acta Virology*, v.53, p.255-260, 2009.

ROSS, N.; O'SULLIVAN, G.; ROTHWELL, C.; SMITH, G.; BURGESS, S.C.; RENNIE, M.; LEE, L.F.; DAVISON, T.F. Marek's disease virus EcoRI-Q gene (meq) and a small RNA antisense to ICP4 are abundantly expressed in CD4+ cells and cells carrying a novel lymphoid marker, AV37, in Marek's disease lymphomas. *Journal of General Virology*, v.78, p.2191-2198, 1997.

ROSS, L.J.N. Recombinant vaccines against Marek's disease. *Avian Pathology*, v.27, p. 65-73, 1998.

ROSS, N.L.J. T-cell transformation by Marek's disease virus. *Trends Microbiology*, v.7, p.22-29, 1999.

RUPLEY, A. E. Manual de clínica aviária. São Paulo, SP: Rocca, 1999.

SANTOS, B.M.; MOREIRA, M.A.; DIAS, C.C.A. Manual de Doenças Avícolas. Editora UFV, p.64, 2008.

SCHAT, K.A. Marek's disease: a model for protection against herpesvirus-induced tumors. *Cancer Surv*, v. 6, p.1-37, 1987.

SCHAT, K.A.; NAIR, V. Marek's disease. In: Diseases of Poultry, Twelfth Edition, Saif Y.M. et al., eds. Blackwell Publishing, Ames Iowa, USA, p. 452–514, 2008.

SCHAT, K. A.; NAIR, V. Neoplastic Diseases. In: Diseases of Poultry, 13th ed. (SWAYNE, D. E.; GLISSON, J. R.; MCDUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SUAREZ, D. L.; NAIR, V. L. eds.), John Wiley & Sons, Inc., Ames, p.513-673, 2013.

SACHSE, K.; LAROCAU, K.; VORIMORE, F. DNA microarray genotyping of Chlamydophila psittaci strains from culture and clinical samples. Vet. Microbiol., v. 135, p. 22-30, 2009a. SCHAT, K.A.; CALNEK, B.W.; FABRICANT, J.; ABPLANALP, H. Influence of oncogenicity of Marek's disease virus on evaluation of genetic resistance. Poultry Science, v.60, p.2559-2566, 1981.

SCHAT, K.A., CALNEK, B.W.; FABRICANT, J. Avian Pathology, v.11, p.593, 1982

SCHAT, K. A.; VAN SANTEN, V. L. Chicken Infectious Anemia. In: Diseases of Poultry, 13th ed. (Swayne, D. E., Glisson, J. R., McDougald, L. R., Nolan, L. K., Suarez, D. L. and Nair, V. L. eds.), John Wiley & Sons, Inc., Ames, p.248-264, 2013.

SEVOIAN, M.; CHAMBERLAIN, D.M.; COUNTER, F.T. Avian lymphomatosis. I. Experimental reproduction of the neural and visceral forms. Veterinary Medical, v.57, p.500–501, 1962.

SHAMBLIN, C.E.; GREENE, N.; ARUMUGASWAMI, V.; DIENGLEWICZ, R.L.; PARCELLS, M.S.

Comparative analysis of Marek's disease virus (MDV) glycoprotein, lytic antigen pp38- and transformation antigen Meq-encoding genes: association of meq mutations with MDVs of high virulence. Veterinary Microbiology, v.102, p.147–167, 2004.

SHEK, W. R.; CALNEK, B.W.; SCHAT, K.A.; CHEN, C.L.H. Characterization of Marek's disease virus- infected lymphocytes: discrimination between cytolytically and latently infected cells. Journal of the National Cancer Institute, v.70, p.485–491, 1983.72

SUNG, H.W. Recent Increase of Marek's Disease in Korea Related to the Virulence Increase of the Virus. Avian diseases, v.46, p.517-524, 2002.

SILVA J. J. G. Eletroforese de proteínas: guia pratico-teorico. Rio de Janeiro. Editora Interciencia, 2010

TENG, L. Q.; WEI, P.; SONG, Z. B.; HE, J. J.; CUI, Z. Z. Molecular epidemiological investigation of Marek's disease virus from Guangxi, China. Archives of virology, v.156, p. 203-206, 2011

TIAN, M.; ZHAO, Y.; LIN, Y.; ZOU, N.; LIU, C.; LIU, P.; CAO, S.; WEN, X.; HUANG, Y. Comparative

analysis of oncogenic genes revealed unique evolutionary features of field Marek's disease virus prevalent in recent years in China. *Virology Journal*, v.8, p.1-11, 2011.

TIMENETSKY, J. Micoplasmose-conceitos gerais. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. e organizadores. *Patologia Aviária*. Manole. Barueri-SP, 510p, 2009.

TODD, D.; MAWHINNEY, K. A.; MCNULTY, M. S. Detection and differentiation of chicken anemia virus isolates by using the polymerase chain reaction. *Journal Clinical Microbiology*, n.30, p. 1661-1666, 1992.

TORRES, A. C. D. et al. An Overview on Marek's Disease Virus Evolution and Evidence for Increased Virulence in Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 21, n. 1, 2019a.

TORRES, A. C. D. et al. An Outbreak of Intestinal Obstruction by *Ascaridia Galli* in Broilers in Minas Gerais. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 21, n. 4, 2019b.

TULMAN, E. R.; AFONSO, C. L.; LU, Z.; ZSAK, L.; ROCK, D. L.; KUTISH, G. F. The genome of a very virulent Marek's disease virus. *Journal of Virology*, v.74, p.7980-7988, 2000.

VENUGOPAL, K., BLAND, A.P., ROSS, L.J.N. & PAYNE, L.N. Pathogenicity of an unusual highly virulent Marek's disease virus isolated in the United Kindom. In SILVA, R.F.;CHENG, H.H.; COUSSENS, P.M.; LEE, L.F.; VELICER, L.F. (Eds.), *Current Research on Marek's Disease*. Proceedings of the 5th International Symposium on Marek's Disease. Kellogg Center, Michigan State University, East Lansing, MI, USA, p.119- 124, 2000.

VON BULOW, V., FUCHS, B., VIELITZ, E.; LANDGRAF, H. Early mortality syndrome of chickens after dual infection with Marek's disease virus (MDV) and chicken anemia agent (CAA). *Journal of Veterinary Medicine*, p.742-750, 1983.

ZANELLA, A.; DALL'ARA, P.; LAVAZZA, A.; MARCHI, R.; MORENA, M.A.; RAMPIN, T. Interaction between Marek's disease virus and chicken infectious anemia virus. In SCHAT, K.A.; MORGAN, R.M.; PARCELLS, M.S.; SPENCER, J.L. editors. *Current progress on Marek's disease research*. Kennett Square: American Association of Avian Pathologists, p.1119, 2001.

ZANELLA, A.; MARCHI, R.; ROSI, P. Internation Symposium on Marek's disease . Eds CALNEK, B.W.; SPANCER, J.L. Pennsylvania, American Association of Avian Pathologists Inc, p.555, 1985.

ZHANG, Y. P.; LIU, C.J.; ZHANG, F.; SHI,W.; LI, J.. Sequence analysis of the Meq gene in the predominant Marek's disease virus strains isolated in China during 2006–2008. *Virus Genes*, v. 43, p.353–357, 2011.

ZHANG, F.; LIU,C.J.; ZHANG, Y.P.; LI, Z.J.; LIU, A.L.; F. H. YAN, F. CONG, AND Y. CHENG.

Comparative full-length sequence analysis of Marek's disease virus vaccine strain 814. *Arch. Virology*, 157:177–183, 2012.

ZHANG, Y.P.; LI, Z.J.; BAO, K.Y.; LV, H.C.; GAO, Y.L.; GAO, H.L.; QI, X.L.; CUI, H.Y.; WANG, Y.Q.; REN, X.G.; WANG, X.M.; LIU, G.J. Pathogenic characteristics of Marek's disease virus field strains prevalent in China and the effectiveness of existing vaccines against them. *Veterinary Microbiology*, v.177, p.62-68, 2015.

WAJID, S.J.; KATZ, M.E.; RENZ, K.G.; WALKDEN-BROWN, S.W. Prevalence of Marek's Disease Virus in Different Chicken Populations in Iraq and Indicative Virulence Based on Sequence Variation in the EcoRI-Q (meq) Gene. *Avian diseases*, v.57, p.562-568, 2013.

WITTER, R. L.; LEE, L. F.; BACON, L. D.; SMITH, E.J. Depression of vaccinal immunity to Marek's disease by infection with reticuloendotheliosis virus. *Infection and Immunity*, v.26, p.90–98, 1979.

WITTER, R.L.; SHARMA, J.M.; FADLY, A.M. Pathogenicity of variant Marek's disease virus isolants in vaccinated and unvaccinated chickens. *Avian Diseases*, v.24, p.210-232, 1980.

WITTER, R.L. *Avian Pathology*, v.27, p. 113, 1983.

WITTER, R. L. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Disease*, v.41, p.149–163, 1997.

WITTER, R. L. Marek's disease virus vaccines—past, present and future (chicken vs. virus —a battle of the centuries). In: *Current progression Marek's disease research. Proc. 6th International Symposium on Marek's Diseases*. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA, p. 1–9, 2001.

WITTER, R.L.; SCHAT, K.A. Marek's disease. In SAIF, Y.M.; BARNES, H.J.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; McDOUGALD, L.R.; SWAYNE, E (ed) *Diseases of Poultry*, 11th ed. Iowa State University Press, Ames, IA, p.407-465, 2003.

WITTER, R. L.; GIMENO, I. M. Susceptibility of adult chickens, with and without prior vaccination, to challenge with Marek's disease virus. *Avian diseases*, v. 50, n. 3, p. 354-365, 2006.

WOZNIAKOWSKI, G., SAMOREK-SALAMONOWICZ, E.; KOZDRUN, W. Sequence analysis of meq oncogene among Polish strains of Marek's disease. *Polish journal of veterinary sciences*, v.13(2), p.263, 2010.

WOZNIAKOWSKI, G.; SAMOREK-SALAMONOWICZ, E.; KOZDRUN, W. Molecular characteristics of Polish field strains of Marek's disease herpesvirus isolated from vaccinated chickens. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.53, p.10, 2011.

WOŹNIAKOWSKI, G.; SAMOREK-SALAMONOWICZ, E.; KOZDRUŃ, W. Molecular characteristics of Polish field strains of Marek's disease herpesvirus isolated from vaccinated chickens. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 53, n. 1, p. 1, 2011.

WOZNIAKOWSKI, G.; SAMOREK-SALAMONOWICZ, E.; Molecular evolution of Marek's disease virus (MDV) field strains in a 40-year time period. *Avian diseases*, v. 58, n. 4, p. 550-557, 2014.

YU, Z.H.; TENG, M.; LUO, J.; WANG, X.W.; DING, K.; YU, L.L.; SU, J.W.; CHI, J.Q.; ZHAO, P.; HU, B.; ZHANG, G.P.; LIU, J.X. Molecular characteristics and evolutionary analysis of field Marek's disease virus prevalent in vaccinated chicken flocks in recent years in China. *Virus Genes*, v.47, p.282-291, 2013.

YU, Zhenghao et al. Natural co-infection with two virulent wild strains of Marek's disease virus in a commercial layer flock. *Veterinary microbiology*, v. 240, p. 108501, 2020.

RESULTADOS

A pesquisa realizada revelou a ocorrência generalizada de MDV patogênico e muito patogênico em aves criadas em sistema caipira assim como em frangos industriais, com detecção também de vv+ MDV

Estirpes virulentas e muito virulentas de MDV foram detectadas em galinhas da avicultura industrial e de subsistência. Dos 211 animais testados, 112 (112/211; 53%) foram positivos para o gene Meq, tanto da avicultura (11/28; 39,3%) quanto de avicultura de subsistência (116/183; 63,4%).

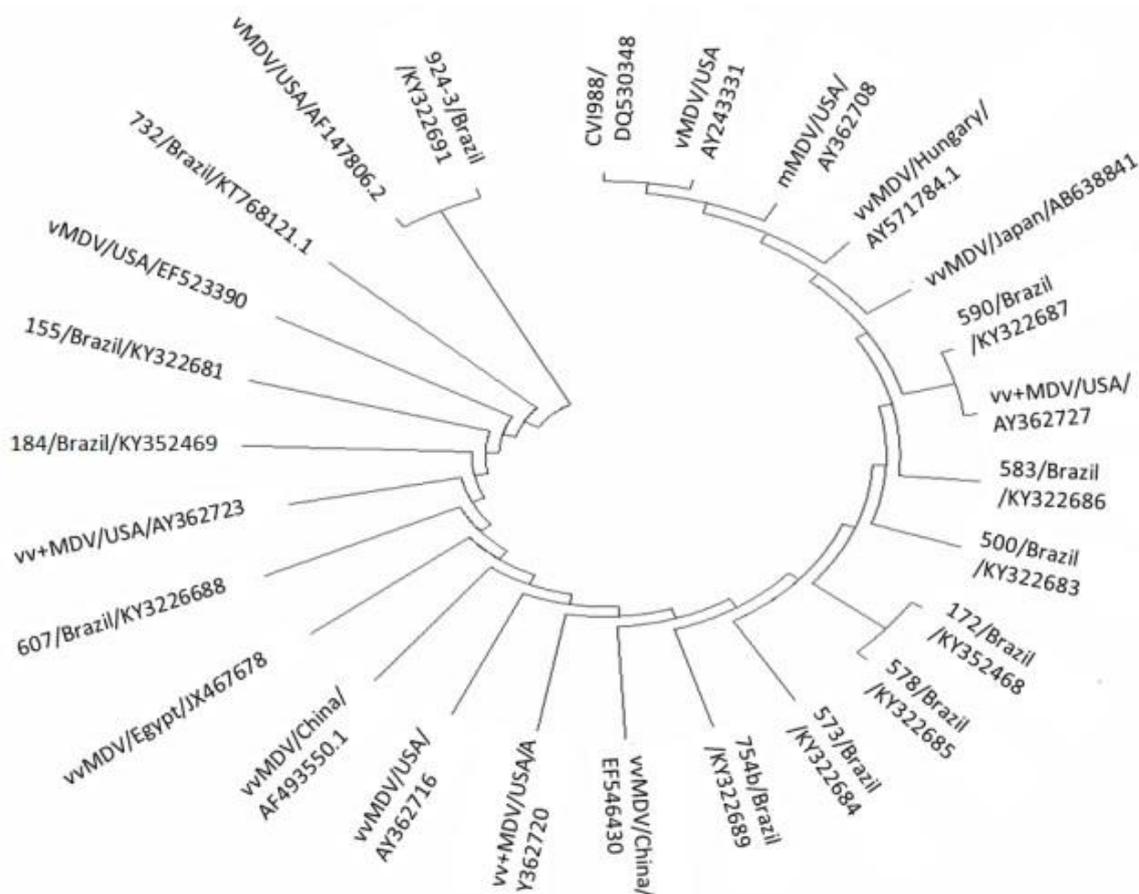
Etiologias concorrentes foram detectadas junto com MDV em 67% dos animais positivos para MDV Meq. Em galinhas caipiras, o MDV foi co-detectado com Mg mgc-2 em 49% das aves, com Ap em 20,5% (principalmente afetado clinicamente - coriza infecciosa), com Cp em 16% e com CAV em 1,8%. Detecções triplas, MDV, Mg e Cp em 10,7% das aves, ou MDV, Mg e Ap em 9%, ou MDV, Ap e Cp em uma ave (0,9%). Considerando frangos da avicultura industrial, o MDV foi detectado em 11/28 (39,3%), com codetecção de MDV / Mg (5/28; 17,8%), MDV / Ap (3/28; 10,7%), e detecção tripla de MDV / Mg / Ap em duas galinhas (7%). O MDV não foi detectado na coinfeção com CAV nem com Cp. O artigo referente à esses dados encontra-se no anexo 2.

Uma filogenia preliminar de cepas de MDV baseada em sequências Meq encontradas em galinhas caipiras e industriais em Minas Gerais foi determinada (Figura 2). As relações evolutivas das cepas do vírus da doença de Marek de galinhas industriais ou criadas ao ar livre mostraram que quase todos os isolados apresentaram identidade com as cepas de vvMDV da China, Hungria e dos EUA. A estirpe 590 (KY322687) agrupou-se com a estirpe vv + MDV 686 de Arkansas (AY362727). O artigo publicado referente à esses dados encontra-se no anexo 1.

Surtos naturais em galinhas caipiras e envolvendo o MD clássico, incluem nervos periféricos aumentados, como o nervo vago em região proventricular/ventricular (Fig. 3A) e na região cervical (Fig. 3B).

A caracterização molecular de estirpes brasileiras de MDV revelou a presença de estirpes muito virulentas (vvMDV), tanto da avicultura industrial como de subsistência. Por exemplo, a estirpe 157 (número de acesso KY322682), entre uma dezena de outras, obtida em Minas Gerais, foi agrupada com GXY2 (EF546430.1), uma estirpe da China que causou tumores agudos em plantéis vacinados com a estirpe atenuada de MDV sorotipo 1 CVI988 (Rispens). Os estudos indicam um alerta para a avicultura brasileira, tendo em vista a proteção parcial das vacinas regularmente utilizadas no país contra estirpes de alta virulência, conforme as evidências de outros países, exigindo monitoramento das estirpes de campo e revisão das estratégias vacinais.

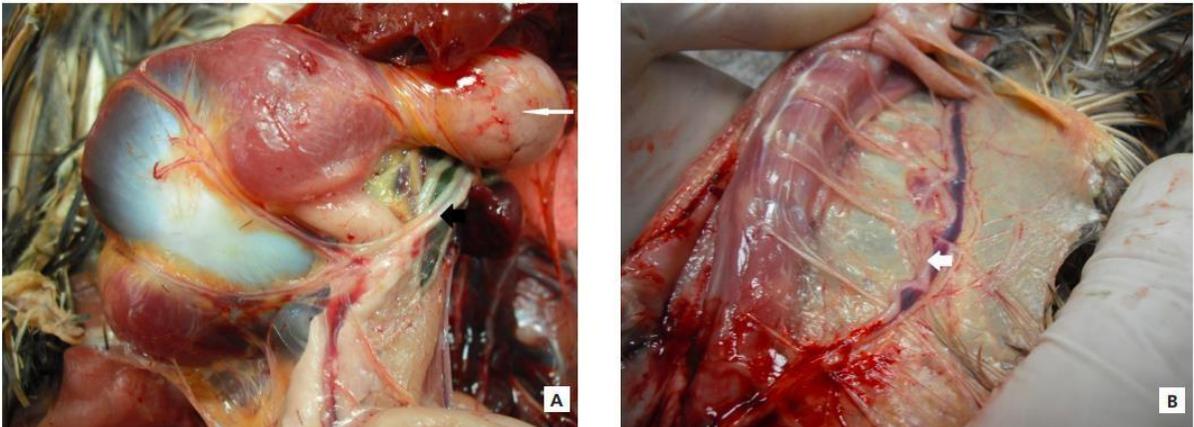
Figura 2 - Relações evolutivas de cepas brasileiras do vírus da doença de Marek



Cepas brasileiras de MDV de galinhas criadas ao ar livre ou industriais foram avaliadas com base nas sequências do gene meq. A cepa 157 (número de acesso KY322682) foi agrupada com GXY2(EF546430.1), uma cepa de MDV muito virulenta da China que causou tumores agudos em galinhas vacinadas com CVI988 (Rispen) ou HVT. Cepas 500 (KY322683), 573 (KY322684), 578 (KY322685), 590 (KY322689), 754b

(KY322689) e 755 (KT768121.1) tinham identidade com MDV virulento (vMDV). Cepas 500 (KY322683) (Fig. 2), 754b (KY322689) e 755 (KT768121.1) causou grave doença inflamatória dos nervos periféricos em galinhas caipiras. As cepas 1042 (KY352470), 92A-3 (KY322691) e 155 (KY322681) tiveram substituições não oncogênicas meq compatíveis com cepas de MDV altamente virulentas (vvMDV) e agrupadas separadamente. A cepa de vacina de herpesvírus de perus (HVT) foi adicionada como um herpesvírus heterólogo. O a história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining (Saitou N. e Nei M., 1987). A árvore ótima com a soma do comprimento do ramo = 5,6821085 é mostrada. A árvore é desenhada em escala, com os comprimentos dos ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o Método de Máxima Verossimilhança Composto (Tamura, Nei e Kumar, 2004) e estão nas unidades do número de substituições de bases por site. A análise envolveu 13 sequências de nucleotídeos. As posições de códon incluídas foram 1ª + 2ª + 3ª + Não codificantes. Todas as posições contendo lacunas e dados perdidos foram eliminadas. Havia um total de 353 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA7 (Kumar, Stecher & Tamura, 2016).

Figura 3 – Caso natural de doença de Marek pela estirpe 500.



Na imagem A é possível observar o nervo vago esquerdo aumentado indicado pela seta preta e também abaixo do proventrículo indicado pela seta fina branca. Na imagem B indicado pela seta branca é possível observar o nervo vago esquerdo na região cervical extremamente espesso junto com a veia jugular, com ramos aumentados.

DISCUSSÃO

Embora MD tenha sido estudado em aves de países produtores em todo o mundo, estudos no Brasil são escassos, principalmente no que se refere à caracterização da virulência das cepas de MDV. Dessa forma, os resultados encontrados em nosso estudo revelam um cenário preocupante, pois a partir de então temos dados concretos sob a circulação no Brasil de estirpes de alta virulência. Esse resultado torna-se preocupante do ponto de vista epidemiológico, pois é possível que futuros surtos de MD venham a ocorrer com o envolvimento dessas cepas de maior virulência e as perdas serão enormes, tendo em vista que as vacinas atualmente utilizadas no sistema industrial não conferem imunização frente às essas estirpes.

Uma preocupação adicional veio à tona no Brasil, com a descrição de MD em pavão (*Pavo cristatus*) em um parque zoológico, caracterizado por viscerais linfomatose e a detecção de um MDV virulento (sorotipo 1) cepa, por meio de PCR e sequenciamento parcial do gene que codifica a proteína Meq (Blume et al., 2016). Doença tumoral no fígado, baço, rins e pele, embora com leve expressão clínica, foi caracterizado pela histopatologia como DM em frangos caipiras no Rio de Janeiro (Abreu et al., 2016). Folículos de penas espessados e tumores esbranquiçados focais sugestivo de DM no fígado, coração, rins, baço, ovário, proventrículo e nervos periféricos de frangos da indústria avícola foram descritas durante 1999 a 2003 (Sousa, 2010) em Minas Gerais, Brasil.

Conclusões preliminares sugerem que o eventual ressurgimento de DM no Brasil poderia estar principalmente associado a mudanças genéticas de meq resultando em insuficiente proteção através de vacinação única HVT (Wozniakowski & Samorek Salamonowicz, 2014).

O surgimento de estirpes vvMDV no Brasil pode resultar de mecanismos semelhantes, conforme descrito em Alemanha, França, países mediterrâneos, Japão e o Reino Unido (Boer et al., 1985), Argentina (Buscaglia et al., 1995) e Colômbia (López- Osório et al., 2017). No Brasil, a pressão seletiva induzida pela vacinação de pintos com a cepa HVT FC126, pode ter habilitado de forma semelhante cepas variadas com vantagem

em evolução, conforme detectado até o final da década de 1970 em bandos vacinados, no EUA e em outros lugares (Eidson et al., 1978; Eidson et al., 1981; Schat et al., 1981; Powell e Lombardini, 1986; McKimm-Breschkin et al., 1990; Imai et al.; 1992; Baigent et al., 1998; Sung, 2002). No entanto, de forma diferente para outros países, o surgimento de doenças clínicas é ainda insignificante.

A ocorrência de vvMDV em galinhas caipiras podem surgir de eventual proximidade da avicultura industrial, tendo em vista que a criação caipira não apresenta manejo sanitário preventivo satisfatório. Cepas de MDV detectadas no Brasil foram avaliadas para sequências do gene meq (Fig. 2). Estirpe 157 (número KY322682) foi agrupada com GXY2 (EF546430.1), uma cepa MDV muito virulenta que causou tumores agudos em CVI988 (Rispens) ou vacinados com HVT galinhas na China. Esse é um dado de extrema relevância, pois anterior a essa pesquisa não existia no Brasil dados concretos em relação à virulência do MDV em galinhas. É ainda, um dado revelador e preocupante ao mesmo tempo, pois nos indica que temos circulantes no Brasil estirpes com potencial para causar futuros surtos e consequentemente perdas econômicas para nosso país.

Cepas 500 (KY322683), 573 (KY322684), 578 (KY322685), 590 (KY322689), 754b (KY322689) e 755 (KT768121.1) foram considerados MDV virulento (vMDV). Cepas 500 (KY322683) (Fig.3), 754b (KY322689) e 755 (KT768121.1) foram detectadas em galinhas com alteração inflamatório do nervo ciático. Cepas 1042 (KY352470), 924-3 (KY322691) e 155 (KY322681) tinham identidade com cepas de MDV altamente virulentas (vvMDV).

Outro ponto de extrema importância revelado no estudo foram os dados referentes às co-infecções. É de domínio público que a existência de dois ou mais patógenos em um organismo ao mesmo tempo potencializam a depressão imune do animal. Com isso, podemos pensar que agentes como o MDV coexistindo no organismo animal com outro agente etiológico, poderia apresentar vantagem frente à seu avanço no sistema. E quando elevamos esse cenário para a infecção relacionada à estirpes de MDV de alta virulência o quadro torna-se ainda mais preocupante, pois a instalação e a disseminação dessa estirpe pelas aves do plantel torna-se ainda mais facilitada. Artigos publicados referentes à agentes potencializadores da depressão imune encontram-se nos anexos 3(submissão realizada em 2018 e publicação retrospectiva a 2016) e 4.

REFERÊNCIAS

- ABREU, D. L. C. et al. Pathological aspects of a subclinical Marek's disease case in free-range chickens. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 18, n. 1, p. 197- 200, 2016.
- BAIGENT, Susan J.; ROSS, L. J.; DAVISON, T. F. Differential susceptibility to Marek's disease is associated with differences in number, but not phenotype or location, of pp38+ lymphocytes. *Journal of general virology*, v. 79, n. 11, p. 2795-2802, 1998.
- BAIGENT, S.J.; KGOSANA, L.B.; GAMAWA, A.A. Relationship between levels of very virulent MDV in poultry dust and in feather tips from vaccinated chickens. *Avian Diseases*, v.57, p. 440-447, 2013.
- BLUME, G. R.; CARDOSO, S. P.; OLIVEIRA, M. L. B.; MATIOLLI, M. P.; GÓMEZ, S. Y. M.; REIS JÚNIOR, J. L.; MARTINS, N. R. S. Visceral Marek's disease in white-peafowl (*Pavo cristatus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.68(6), p.1602-1608, 2016.
- BOER, D.G.F.; GROENENDAL, J.E.; OEI, H.L.; POL, J.M.A. International Symposium on Marek's disease. Eds B.W. Calnek and J.L.Spencer. Pennsylvania. American Association of Avian Pathologists, p.531, 1985.
- BUSCAGLIA, C.; NERVI, P.; GARBI, J.L.; PISCOPO, M. Isolation of very virulent strains of Marek's disease virus from vaccinated chickens in Argentina. *Proceedings of the 44th Western Poultry DiseaseConference*. Sacramento, CA, USA, p..53-57, 1995.
- DE SOUSA, Eliane. Registro da doença de Marek, Leucose aviária e doença Infecciosa da bolsa na Região do Triângulo Mineiro, no período de 1999 a 2003. *PUBVET*, v. 4, p. Art. 893-898, 2010.
- EIDSON, C.S., PAGE, R.K.; KLEVEN, S.H. Effectiveness of cell-free and cell-associated turkey herpesvirus vaccine against Marek's disease in chickens as influenced by maternal antibody, vaccine dose, and time of exposure to Marek's disease virus. *Avian Diseases*, v.22, p. 583-597, 1978.
- EIDSON, C.S.; ELLIS, M.N.; KLEVEN, S.H. *Poultry Science*, v.60, p.317, 1981
- IMAI, K.; YUASA, N.; IWAKIRI, H.; NAKAMURA, K.; HIHARA, H.; ISNITA, T.; INAMOTO, A.;
- OKARNOTO, I.; OHTA, K.; MAEDA, M. Characterization of very virulent Marek's disease virus isolated in Japan. *Avian Pathology*, v.21, p.119-126, 1992.
- KUMAR S., G. STECHER, and K. TAMURA. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, v.33, 1870-1874, 2016.
- LÓPEZ-OSORIO, Sara et al. Molecular characterization of Marek's disease virus in a poultry layer farm from Colombia. *Poultry science*, v. 96, n. 6, p. 1598-1608, 2017.
- MCKIMM-BRESCHKIN, J. L.; FARAGHER, J. T.; WITHELL, J.; FORSYTH, W. M. Isolation of very virulent Marek's disease viruses from vaccinated chickens in Australia. *Australian veterinary journal*, v.67(6), 99. 205- 209, 1990.
- POWELL, P.C.; LOMBARDINI, F. Marek's disease: a worldwide problem. *World's Poultry Science*, v.42, p.205-218, 1986.
- SAITOU N. and N. NEI. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425, 1987.

SCHAT, K.A.; CALNEK, B.W.; FABRICANT, J.; ABPLANALP, H. Influence of oncogenicity of Marek's disease virus on evaluation of genetic resistance. *Poultry Science*, v.60, p.2559-2566, 1981.

SUNG, H.W. Recent Increase of Marek's Disease in Korea Related to the Virulence Increase of the Virus. *Avian diseases*, v.46, p.517-524, 2002.

TAMURA K., M. NEI, and S. KUMAR. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighborjoining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035, 2004.

WOZNIAKOWSKI G, SAMOREK-SALAMONOWICZ E. Molecular evolution of Marek's disease virus (MDV) field strains in a 40-year time period. *Avian Diseases*;58(4):550-557, 2014.

CONCLUSÕES

Estirpes de MDV foram detectadas na avicultura familiar e industrial em Minas Gerais.

Estirpes de MDV de mediana a alta virulência foram detectadas na avicultura industrial.

As estirpes detectadas na avicultura familiar, mesmo não submetidas à pressão seletiva da imunidade vacinal, também incluíram variantes de alta virulência.

Identidades genéticas com estirpes de alta virulência foram detectadas nas estirpes tanto da avicultura industrial como da familiar.

Múltiplas co-infecções foram detectadas nas aves infectadas por MDV, incluindo etiologias de impacto negativo à saúde e produtividade.

ANEXOS

ANEXO 1

 <p>Brazilian Journal of Poultry Science Revista Brasileira de Ciência Avícola</p> <p>ISSN 1516-635X Jan-Mar 2019 / v.21 / n.1 / 008-010</p> <p>http://dx.doi.org/10.1590/1806-9061-2018-0870</p>	<p>An Overview on Marek's Disease Virus Evolution and Evidence for Increased Virulence in Brazil</p>
<p>Original Articles</p>	
<p>■Author(s)</p> <p>Tomes ACP  https://orcid.org/0000-0002-7199-6517 Marrn SY  https://orcid.org/0000-0002-9374-5991 Costa CS  https://orcid.org/0000-0003-0701-1733 Martins NS  https://orcid.org/0000-0001-8925-2228</p> <p>¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.</p>	<p>ABSTRACT</p> <p>Marek's disease virus (MDV) has been shown to be evolving to higher virulence. One of the genetic sites involved in virulence which enables such characterization is the 339-amino acid Meq protein encoding gene (<i>meq</i>). The reemergence of clinical Marek's disease (MD) in vaccinated flocks can be associated to changes in <i>meq</i>. Our studies have shown the presence of very virulent MDV strains in the Brazilian industrial and free-range poultry. We present an overview of MD increasing severity and indicate the necessity of using phylogenetic tools for best accompanying MDV evolution.</p>
<p>■Mail Address</p> <p>Corresponding author e-mail address Nelson Rodrigo da Silva Martins Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Phone: +55 31 34092093 Email: nelosmar1@gmail.com</p>	<p>INTRODUCTION</p> <p>During the last fifty years, the increased intensification of poultry has provided high numbers of chickens concentrated in industrial farms and specific geographical areas. The proximity of large flocks of chickens, of varied immune and health status, has enabled the circulation of infections, such as Marek's disease (MD), infectious bronchitis, infectious bursal disease, with the emergence of a large number and diversity of pathogens, as described for MDV. The extensive vaccination of flocks against MDV has additionally provided selective pressure and possibly genetic diversity for the evolutive advantage of immunity-evading strains. After a few decades of MD vaccination, MDV strains have emerged with ever increasing virulence (Eidson <i>et al.</i>, 1978; Eidson <i>et al.</i>, 1981; Imai <i>et al.</i>; 1992; Mckimm-Breschkin <i>et al.</i>, 1990; Powell & Lombardini, 1986; Sung, 2002; Venugopal, 1996; Witter, 1997; Witter <i>et al.</i>, 2005). The estimated economic burden of MD may reach US \$ 1 to 2 billion annually (Atkins, 2013).</p>
<p>■Keywords</p> <p>Gallid herpesvirus 2, Marek's disease virus, Gallus gallus domesticus, meq gene, virulence.</p>	<p>The breakthrough description of a herpesvirus in MD tumors enabled the differentiation between Marek's disease and lymphoid Leukosis (Churchill & Biggs, 1967; Nazerian <i>et al.</i>, 1968; Solomon <i>et al.</i>, 1968), formerly considered as part of the avian leukosis complex. Consequently, research rapidly provided the tools for the prevention of MD. The understanding of the transmission mechanism and risk of infection was achieved when experimental infection with cell-free MDV of feather follicle desquamation epithelium was demonstrated (Beasley <i>et al.</i>, 1970; Calnek <i>et al.</i>, 1969; Calnek <i>et al.</i>, 1970a). The virus was serially passaged in primary kidney cell monolayers and successfully attenuated (Churchill <i>et al.</i>, 1969), and given to one-day-old chicks induced protection against the challenge (Calnek <i>et al.</i>, 1970b), subsequently also acquired by naturally a virulent strains isolated from turkeys (Witter <i>et al.</i>, 1970b) and chickens (Biggs & Milne, 1972; Cho & Kenzy, 1972). Among the isolated a virulent low virulence MDV strains, the CVI 988 vaccines became popular or of (Rispen <i>et al.</i>, 1972) and SB-1 (Schat & Calnek, 1978).</p>
<p>Submitted: 27/August/2018 Approved: 05/November/2018</p>	<p style="text-align: center;">1</p> <p style="text-align: right;">eRBCA-2019-0870</p>



Marek's disease virus

MDV is classified as *Gallid Herpesvirus 2*, genus *Mardivirus*, family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, and divided into three serotypes MDV-1 (RB-1B, Md5 and CV1988), MDV-2 (SB-1 e HPRS24), and the antigenically related *Meleagrid Herpesvirus-1* (known as serotype three; herpes virus of turkeys- strain FC126) (ICTV, 2018; Dunn *et al.*, 2014). Only strains of serotype 1 are capable of causing disease, while MDV-2 e MDV-3 strains are a virulent (Calnek, 2001). The classification of MDV according to pathotype was reviewed, including the philosophical and methodological aspects (Witter *et al.*, 2005). The correlation between MDV replication and virulence was shown for vMDV and wMDV strains, although a non-significant difference was found between very virulent (vv) and vv+MDV isolates (Dunn *et al.*, 2014).

MDV genome is large and encodes for more than 200 genes, including genes that are involved in pathogenicity, such as *meq* (Jones *et al.*, 1992; Lupiani *et al.*, 2004; Nair, 2013). MDV genomic integration was demonstrated in host cells (Nikura *et al.*, 2006). MDV encodes a basic-leucine zipper protein (MDV EcoRI-Q), similar to the *fos/jun* oncogenes products, that is highly expressed in tumors (Jones *et al.*, 1992). *Meq* is involved in the transformation of T-lymphocytes but not needed for replication (Lupiani *et al.*, 2004). *Meq* protein is a 339-phosphoprotein expressed abundantly by *meq* during the lytic and latent phases of cellular interaction (Gennart *et al.*, 2015), activating transcription and involved in the transformation of T lymphocytes (Gennart *et al.*, 2015; Brown *et al.*, 2009). Although *meq* is consistently associated to pathogenicity, other genes were shown to be involved (Wozniakowski *et al.*, 2010; Jarosinski *et al.*, 2006), such as *vTR* (Fragnet *et al.*, 2005; Trapp *et al.*, 2006) and *vil-8* e *pp38*. However, the oncogenicity was retained by a MDV mutant (RB1BD4.5lac) lacking unique short region genes (Parcells *et al.*, 1995).

The *meq* encoded oncogenic protein *Meq* is detected in all MD tumors (Ross, 1999). *Meq* interferes negatively with the expression (down-regulates) of cellular apoptosis genes, and up-regulates viral genes involved in cellular transformation (Liu & Kung, 1999), as well as its own expression. MDV lacking *meq* is not oncogenic, as for serotypes 2 and 3, and its deletion of pathogenic strains will result in loss of oncogenicity (Silva *et al.*, 2010; McPherson & Delany, 2016). The equilibrium of cell-virus interaction during persistence is genetically determined in Herpes simplex virus (HSV) persistently infected cells, and gradual increase in

virulence as opposed to cellular resistance would result in tumorigenesis (Cummings *et al.*, 1989).

Latency starts approximately within one week of infection, mainly in T lymphocytes CD4+, although the transition from cytolytic to latent infection is not entirely understood (Nair, 2013). Latently infected T CD4+ cells in genetically susceptible unvaccinated chickens are transformed and originate tumors (McPherson & Delany, 2016), and may systemically disseminate MDV through the feather follicle epithelium, where the productive replication may resume, disseminating MDV to the environment and housing in desquamating epithelial cells (Baigent & Davison, 2004; Baigent *et al.*, 2013). During latency in T CD4+, the productive (lytic) infection is suppressed and apoptosis is blocked (Baigent *et al.*, 1998). MDV reactivation in latently infected lymphocytes will result in elevated genetic expression (McPherson & Delany, 2016). The mechanisms of latency and transformation are not well understood (Nair, 2013), although both are associated to genomic integration (NAIR, 2005), and a few T CD4+ lymphocytes will undergo transformation and give rise of T-cell tumor lineages (Calnek, 2001). Latency is mediated by the *Meq* protein by blocking apoptosis and gene expression is transactivated and reactivation is dependable on *meq* repression and expression of phosphoprotein 38 (pp38), Hep and Mys encoding open reading frames (Parcells *et al.*, 2003), and the susceptibility is determined by higher numbers of pp38+ lymphocytes (Baigent *et al.*, 1998).

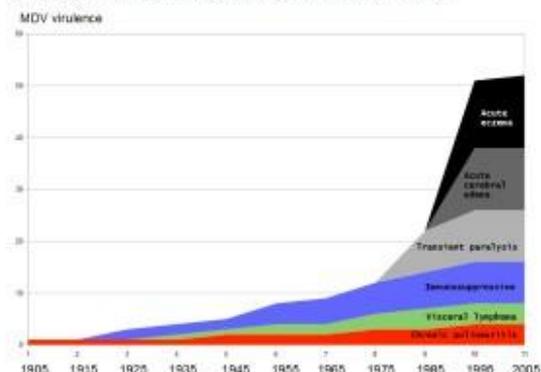


Figure 1 – Marek's disease chronological increase in severity and acuteness. (Adapted from Ostermeyer *et al.*, 2006).

MD in Brazil

Although MD has been studied in the poultry producing countries all over the world, studies in Brazil are scarce, especially regarding the characterization of MDV strains virulence. Research in our laboratory



An additional preoccupation has come to light in Brazil, with the description of MD in peafowl (*Pavo cristatus*) at a Zoological Park, characterized by visceral lymphomatosis and the detection of a virulent MDV (serotype 1) strain, through PCR and partial sequencing of the Meq protein encoding gene (Blume *et al.*, 2016). Tumoral disease in the liver, spleen, kidneys and skin, although with mild clinical expression, was characterized by histopathology as MD in free-range chickens in Rio de Janeiro (Abreu *et al.*, 2016). Thickened feather follicles and focal whitish tumors suggestive of MD in liver, heart, kidneys, spleen, ovary, proventriculus and peripheral nerves of broilers and layers of the poultry industry were described during 1999 to 2003 (Sousa, 2010) in Minas Gerais, Brazil.

MD vaccination

MD control through vaccination was paramount for the growth of the poultry industry. However, the increasing virulence of MDV strains may however compromise the success of control through vaccination (Witter, 1997) and reports of wMDV are spread worldwide (López-Osório *et al.*, 2017). The pioneering experiments with vaccines were developed almost immediately after the description of MD etiology (Churchill & Biggs, 1967), with its attenuation by the end of the 1960's (Churchill *et al.*, 1969) and the discovery of a virulent strains in turkeys (Witter *et al.*, 1970) and chickens (Biggs & Milne, 1972; Cho & Kenzy, 1972).

The vaccination of chickens against MD is mandatory in the Brazilian poultry industry and must be given at the 18th day of incubation or at the day of hatching (Brasil, 2007). MD vaccines in use in Brazil should contain 1,500 plaque forming units per dose and are prepared with live *Meleagrid Herpesvirus 1* (FC-126) and/or CVI988/Rispens (*Gallid Herpesvirus 2*) or SB1 (*Gallid Herpesvirus 3*) and may be monovalent or polyvalent (OIE, 2018). However, imperfect vaccination would enhance transmission of highly virulent MDV strains and other pathogens (Read *et al.*, 2015).

Increased virulence

A comprehensive review was previously published, indicating the advancement of knowledge regarding MDV interaction with host cells and virulence (Osterrieder *et al.*, 2006) (Fig. 1).

One of the driving forces involved in MDV selection to higher virulence is the immune response, possibly more relevant if vaccine derived (Davison & Nair, 2005). The pioneering description of potential evolution to

evading vaccination protection was proposed very early after adoption of HVT vaccine (Okazaki *et al.*, 1973). Virulence may evolve partially due to a compromise loss between damage and infection, and although pathogenicity might evolve from competition with the host, bacterial virulence would evolve from within the host pathogen competition (Smith *et al.*, 2011).

Since the first description of MD in 1907, up to 1915, the principal form of clinical presentation was chronic polyneuritis. Starting from 1915 to approximately 1925, increasing number of cases of immunosuppression were registered. From 1925 up to 1975, visceral lymphoma, immuno-suppression and chronic polyneuritis were the clinical forms described in ever increasing incidence. From 1975, transient paralysis began to be encountered in the field. In 1985, cases of acute cerebral edema and acute eczema were additionally described. The classical form of MD was characterized as a paralytic syndrome of relatively low occurrence involving peripheral nerve inflammation, involving more commonly the sciatic, brachial, trigeminal, and vagus nerves, but rarely exceeding 10-15% mortality (OIE, 2018). By the end of the 1950s, with the intensification of the poultry production, more virulent forms of MD were described (Benton & Cover, 1957), characterized by up to 40% mortality in layers and the occurrence of up to 10% of broilers with visceral lymphomatosis.

During the 1960s the more aggressive forms of MD were also described in the United Kingdom (Biggs, 1965), and United States, characterized as more acute and precocious disease with early onset of visceral tumors (Biggs, 1966).

After the generalized use of day-old chicks vaccination against MD, in the beginning of the 1970s, the clinical disease was nearly eradicated, with punctual problems associated to the administration or titer of vaccines, or too early exposure to field MDV (Buscaglia & Crosetti, 1993). However, by the end of the 1970's, visceral and early disease outbreaks were described, and associated to variant MDV strains, including in HVT (*Herpesvirus of turkeys*) vaccinated flocks, in the US and elsewhere (Eidson *et al.*, 1978; Eidson *et al.*, 1981; Schat *et al.*, 1981; Powell & Lombardini, 1986; McKimm-Breschkin *et al.*, 1990; Imai *et al.*; 1992; Sung, 2002).

Several very virulent strains of MDV (wMDV) have been described since the 1980s, with the pathogenicity determined by the capacity of oncogenesis in HVT vaccinated chickens (Eidson *et al.*, 1981). According to the capacity of evading the specific immunity derived



from HVT vaccination, the more virulent MDV strains have been classified as mildly virulent (mMDV), virulent MDV (vMDV), very virulent MDV (vvMDV), and very virulent plus MDV (vv+MDV) (Witter, 1997), being all strains above virulent capable of breaking the vaccinal protection (Wozniakowski & Samorek-Salamonowicz, 2014).

The increased occurrence of vvMDV strains has also been reported in vaccinated flocks in Germany, France, the Mediterranean countries, Japan and the UK (Boer *et al.*, 1985). The description of naturally occurring vvMDV and vv+MDV has also been reported in Argentina in the early 1990s, but initially associated to vaccination error (Buscaglia & Crosetti, 1993). The outbreaks in Argentina were associated to four varying prototypes (Buscaglia *et al.*, 1995), the first vvMDV strains of disease in vaccinated flocks in South America. In Colombia (López-Osório *et al.*, 2017) the strain UDEACO-2013, isolated from an outbreak in chickens, was genetically related to hypervirulent strains of the United States, with the oligonucleotide position substitutions 176 (P/A), 217(P/A) and P233 (P/L) considered as indicative of vvMDV, although not related to other strains around the world, although the amino acid substitution at residue 77 (E/K) was suggestive of mMDV.

The emergence of higher virulence of MDV is associated to the selective pressure induced by the immunity derived from vaccination (Witter, 1997), in addition to the increased genetic resistance by chickens, and has resulted in the widespread description of higher virulence strains, such as in Argentina, India and China (Buscaglia *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2011). In addition, the interaction of MDV with chicken anemia virus might result in evolving advantage (Zanella *et al.*, 2001).

Within the last 15 years, vv+MDV strains have been described principally in vaccinated flocks (Zhang *et al.*, 2011), indicating a lack of protective spectrum for the HVT strain. The molecular analysis of 1020 nucleotides which encode 339 amino acids of the Meq protein of Chinese MDV strains obtained from 2006 to 2008 has shown that all isolates possessed two substitutions of amino acids at residues 139 (T/A) and 176 (P/R), similar to sequences of the attenuated strain CV1988. However, six isolates have shown substitutions at positions 176 or 177 (P/T). Results have suggested a specific clade for the Chinese strains.

Very virulent (vv) MDV strains were first reported in vaccinated chickens in Europe (Powell & Lombardini, 1986) and subsequently in Australia (McKimm-

Breschkin *et al.*, 1990), and Japan (IMAI *et al.*, 1992). In Korea (Sung, 2002), five strains of vvMDV were described in layers and broilers with tumours, with one strain resulting in severe immunosuppression and high incidence of tumors (93,3%) in inoculated SPF chickens. Strains obtained of broiler flocks with visceral tumors in China were not adequately protected with the CV1988 vaccine strain (Zhang *et al.*, 2015), protecting only 66% after the challenge with the LTS strain. MDV phosphoprotein pp38 and meq transformation protein encoding genes were evaluated, and meq mutations were associated to higher virulence (Shamblin *et al.*, 2004).

The meq oncogene sequences of MDV strains of 2006-2008 were analyzed in China (Zhang *et al.*, 2011), revealing 19 strains of broilers with sanitary problems. In Guangxi, the vvMDV strains in vaccinated flocks were genetically distinct of the CV1988/Rispens vaccine strain, in use for 14 years (Teng *et al.*, 2011). The characterization of MDV strains (2007-2010) of vaccinated flocks in Poland (Wozniakowski *et al.*, 2011), revealed the recombination of MDV and REV (reticuloendotheliosis) viruses. Twelve out of 24 isolates had 68 bp insertions in the meq gene, and 0.78, 0.8, 0.82, 1.6 kb and other random LTR-REV insertions in 28 of 29 evaluated strains, although the insertions could influence MDV replication, were not associated to virulence. MDV field strains (n=85) isolated in Poland within the years 1974-2012 were compared, evaluating 85 sequences of MDV076 (RLORF7) region of meq, 60 sequences of MDV077 encoding a 23 kDa protein which binds alpha-enolase and 58 sequences of MDV077.5 (RLORF6) genes. Although the 23 kDa and LORF6 sequences were related to low pathogenic MDV, the RLORF7 sequences were similar to vMDV and vvMDV strains. However, specific motifs within the three genes could be associated to virulence, indicated an increased virulence since 2006 and strains obtained in 2012 were similar to vvMDV+ strains (Wozniakowski *et al.*, 2014).

In Egypt, vaccinated chickens showing neurological and tumoral lesions were investigated. Lesions were mostly observed in the liver, spleen and gonads, as localized or diffuse tumors, although the meq oncogene was detected in five out of the 30 chickens, with substitutions in positions 77(E/K), 80(Y/D), 88(T/A), 112(F/S), 139(A/T) and 176(R/P), although with deduced amino acid sequences showing five strains with identity ($\geq 98\%$) with the vvMDV strains ATE (Hungary), C12/130 (UK) and Chinese LMS, YA, WS03 and GX070060 (Hassanin *et al.*, 2013).



MDV *meq* sequences of strains were evaluated in Japan (Murata *et al.*, 2013) and China (Yu *et al.*, 2013), revealing point mutations and diversity potentially associated to higher oncogenicity. In Iraq (Wajid *et al.*, 2013), MDV was detected in 49.5% of provinces, and based on *meq* sequences, with similar occurrence and identity of vaccinated and non-vaccinated broiler flock's strains.

The genetic diversity of MDV in Saudi Arabia (Mohamed *et al.*, 2016), as based on the *meq* gene, has shown that the strains of chickens with visceral tumors were similar to strains described in Poland, and indicated that the international trade or migratory birds might have a role in the transportation of virus. Although vaccination was implemented for commercial chickens in Colombia (López-Osório *et al.*, 2017), with CVI988/Rispens + HVT vaccine strains in the first day, sporadic cases of MD continue to occur, with mortality reaching up to 30% by 50 weeks of age, and no visible lymphomas were observed. Although MD outbreaks in vaccinated flocks in Argentina (Buscaglia & Crosetti, 1993) during the early 1990s were associated to vaccination failure, MDV strains of higher virulence were detected in later outbreaks (Buscaglia *et al.*, 1995).

The emergence of wMDV strains in Brazil strains might result of similar mechanisms as described in Germany, France, Mediterranean countries, Japan and the UK (Boer *et al.*, 1985), Argentina (Buscaglia *et al.*, 1995) and Colombia (López-Osório *et al.*, 2017). Here, the selective pressure induced by vaccination of chicks with HVT strain FC126, might have similarly enabled varying strains with evolving advantage, as detected by the end of the 1970's in vaccinated flocks, in the US and elsewhere (Eidson *et al.*, 1978; Eidson *et al.*, 1981; Schat *et al.*, 1981; Powell & Lombardini, 1986; McKimm-Breschkin *et al.*, 1990; Imai *et al.*; 1992; Baigent *et al.*, 1998; Sung, 2002). However, differently to other countries, the emergence of clinical disease is still negligible. Different environmental condition for build up and challenge, as observed for infected cells in dust (Baigent *et al.*, 2013) might play a role and may provide additional information regarding risk. In Brazil, most commonly, new chick flocks are housed in carefully cleaned and disinfected houses, which might have been providing reduced challenge, at least with clinically significant doses of field MDV. The occurrence of wMDV in free-range flocks might arise from the eventual proximity of industrial and free-range flocks, common in certain regions, and might also result in continuous spill-over and spill-back mechanisms, although strains could also have emerged independently.

MDV strains detected in Brazil were evaluated for *meq* gene sequences (Fig. 2). Strain 157 (Accession number KY322682) was grouped with GXY2 (EF546430.1), a very virulent MDV strain which caused acute tumors in CVI988 (Rispens) or HVT vaccinated chickens in China. Strains 500 (KY322683), 573 (KY322684), 578 (KY322685), 590 (KY322689), 754b (KY322689) and 755 (KT768121.1) were considered virulent MDV (vMDV). Strains 500 (KY322683) (Fig. 3), 754b (KY322689) and 755 (KT768121.1) were detected in chickens with severe peripheral nerve inflammatory disease. Strains 1042 (KY352470), 924-3 (KY322691) and 155 (KY322681) had identity with highly virulent MDV strains (wMDV) (Fig. 2).

CONCLUSION

The increasing virulence of MDV may pose as a threat to the standard MD prevention strategy, progressively reducing the success of vaccine protection, especially for programs based on HVT strain vaccines. Research and continuing surveys may provide answers regarding the epidemiology of MD, the evolving virulence of circulating MDV strains, and might enable determining the best fit vaccination protocols and strategy.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to CAPES, CNPq and FAPEMIG for financial support and scholarships.

REFERENCES

- Abreu DLC, Santos FF, José DS, Tortelly R, Nascimento ER, Pereira VLA. Pathological aspects of a subclinical marek's disease case in free-range chickens. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 2016;18(1):197-200.
- Atkins KE, Read AE, Savill NJ, Renz KG, Fakhru Islam AFM, *et al.* Vaccination and reduced cohort duration can drive virulence evolution. *Marek's disease virus and industrialized agriculture. Evolution: International Journal of Organic Evolution* 2013;67(3):851-860.
- Baigent SJ, Davison F. Marek's disease virus: biology and life cycle. In: *Marek's disease, an evolving problem*. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2004. p.62-77.
- Baigent SJ, Kgosana LB, Gamawa AA, Smith LP, Read AF, Nair VK. Relationship between levels of very virulent MDV in poultry dust and in feather tips from vaccinated chickens. *Avian Diseases* 2013;52 (2-1):440-447.
- Baigent SJ, Ross LIN, Davison TF. Differential susceptibility to Marek's disease is associated with differences in number, but not phenotype or location, of pp38+ lymphocytes. *Journal of General Virology* 1998;79(11):2795-2802.
- Beasley JN, Patterson LT, McWade DH. Transmission of Marek's disease by poultry house dust and chicken dander. *American Journal of Veterinary Research* 1970;31:339-344.



- Benton WJ, Cover MS. The increased incidence of visceral lymphomatosis in broiler and replacement birds. *Avian Diseases* 1957;1:320-327.
- Biggs PM, Milne BS. Biological properties of a number of Marek's disease virus isolates. In: Biggs PM, Thé GF, Payne LN, editors. *Oncogenesis and herpesviruses*. Lyon: IARC; 1972. p.88-94.
- Biggs PM. Avian leukosis and Marek's disease. Proceedings of the Thirteenth World's Poultry Congress Symposium; 1966; Kiev, Russia; 1966. p.91-118.
- Biggs PM. Avian transmissible tumours. Proceedings 3rd Congress of the World Veterinary Poultry Association; 1965; Paris. p.61-67.
- Blume GR, Cardoso SP, Oliveira ML, Matioli MP, Gómez SY, Reis Júnior JL, et al. Visceral Marek's disease in white-peafowl (*Pavo cristatus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2016;68(6):1602-1608.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 1990;28(3):495-503.
- Brasil. Manual de Legislação. Programas Nacionais de Saúde Animal do Brasil. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília (DF): Departamento de Saúde Animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; 2009.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução normativa nº 44 de 23 de agosto de 2001. Aprova as normas técnicas para o controle e a certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas para a Micoplasmose Aviária (*Mycoplasma gallisepticum*, *synoviae* e *meleagridis*). *Diário Oficial da União*. Brasília, DF. p.68-70, de 24 de ago. de 2001, Seção I.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Gabinete do Ministro. Instrução Normativa nº 56, 4 dez. 2007.
- Brown AC, Smith LP, Kgosana L, Baigent SJ, Nair V, Allday MJ. Homodimerization of the meq viral oncoprotein is necessary for induction of T-cell lymphoma by Marek's disease virus. *Journal of Virology* 2009;83(21):11142-11151.
- Buscaglia C, Crosetti C. Studies on Marek's disease vaccination failures in Argentina. Proceedings of the 4th International Symposium on Marek's Disease and 2nd Meeting on the Cooperative Research Project in the Area of Veterinary Sciences between National University of La Plata and Japan International Cooperation Agency, 1993; La Plata, Argentina, p.19-21, 1993.
- Buscaglia C, Nervi P, Garbi JL, Piscopo M. Isolation of very virulent strains of Marek's disease virus from vaccinated chickens in Argentina. Proceedings of the Western Poultry Disease Conference; 1995; Sacramento; CA; 1995.
- Buscaglia C, Nervi P, Rizzo M. Characterization of four very virulent Argentinian strains of Marek's disease virus and the influence of one of those isolates on synergism between Marek's disease vaccine viruses. *Avian Pathology* 2004;33(2):190-195.
- Calnek BW, Hitchner SB. Localization of viral antigen in chickens infected with Marek's disease herpesvirus. *Journal of the National Cancer Institute*. 1969;43:935-949.
- Calnek BW, Alexander AM, Kahn DE. Feather follicle epithelium a source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian Diseases* 1970a;14:219-233.
- Calnek BW, Ubertini T, Addinger HK. Viral antigen, virus particles, and infectivity of tissues from chickens with Marek's disease. *Journal of the National Cancer Institute* 1970b;45:341-351.
- Calnek BW. Pathogenesis of Marek's disease virus infection. In: Hira K, editor. *Current topics in microbiology and immunology*. Berlin: Springer-Verlag; 2001. p.25-56.
- Cho BR, Kenzy SG. Isolation and characterization of an isolate (HN) of Marek's disease virus with low pathogenicity. *Applied Microbiology* 1972;24:299-306.
- Churchill AE, Biggs PM. Agent of Marek's disease in tissue culture. *Nature* 1967;215:528-530.
- Churchill AE, Chubb RC, Baxendale W. The attenuation, with loss of oncogenicity, of the herpes-type virus of Marek's disease (strain HPRS-16) on passage in cell culture. *Journal of General Virology* 1969;4(4):557-564.
- Cummings PJ, Rinaldo Jr CR. Coevolution of virulent virus and resistant cells as a mechanism of persistence of herpes simplex virus type 1 in a human T lymphoblastoid cell line. *Journal of General Virology* 1989;70:97-106.
- Davison F, Nair V. Use of Marek's disease vaccines: could they be driving the virus to increasing virulence? *Expert Review of Vaccines* 2005;4(1):77-88.
- De Boer GE, Groenendal JE, Oei HL, Pol JM. Protective efficacy of clones of Marek's disease virus strain CVI-988. Proceedings of the International Symposium on Marek's Disease; 1985; Kennett Square, PA: American Association of Avian Pathologists; 1985. p.531-544.
- Dunn JR, Auten K, Heidari M, Buscaglia C. Correlation between Marek's disease virus pathotype and replication. *Avian Diseases* 2014;58(2):287-292.
- Eidson CS, Page PK, Kleven SH. Effectiveness of cell-free or cell-associated turkey herpesvirus vaccine against Marek's disease in chickens as influenced by maternal antibody, vaccine dose and time of exposure to Marek's disease virus. *Avian Diseases* 1978;22:583-587.
- Eidson CS, Page RK, Kleven SH. In vivo and in vitro studies on the effect of gentamicin sulfate on the efficacy of the turkey herpesvirus vaccine. *Poultry Science* 1978;57(6):1519-1525.
- Fragnet L, Kut E, Rasschaert D. Comparative functional study of the viral telomerase RNA based on natural mutations. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280(25):23502-23515.
- Gernart I, Coupeau D, Pejaković S, Laurent S, Rasschaert D, Muyllkens B. Marek's disease: genetic regulation of Gallid herpesvirus 2 infection and latency. *The Veterinary Journal* 2015;205:339-348.
- Hassanin O, Abdallah F, El-Araby IE. Molecular characterization and phylogenetic analysis of Marek's disease virus from clinical cases of Marek's disease in Egypt. *Avian Diseases* 2013;57:555-561.
- ICTV- International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTV 9th report. Herpesviridae [dated 2018 Feb 16]. 2011. Available from: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsna-viruses-2011/w/dsna_viruses/91/herpesviridae.
- Imai K, Yuasa N, Iwakiri H, Nakamura K, Hihara H, Ishita T, et al. Characterization of very virulent Marek's disease viruses isolated in Japan. *Avian Pathology* 1992;21(1):119-126.
- Jarosiński KW, Karsten Tischer B, Trapp S, Osterrieder N. Marek's disease virus: lytic replication, oncogenesis and control. *Expert Review of Vaccines* 2006;5(6):761-762.
- Jones D, Lee L, Liu JL, Kung HJ, Tillotson JK. Marek's disease virus encodes a basic-leucine zipper gene resembling the fos/jun oncogenes that is highly expressed in lymphoblastoid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89(9):4042-4046.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 2016;33:1870-1874.



- Liu JL, Kung HJ. Marek's disease herpesvirus transforming protein MEQ: a c-Jun analogue with an alternative life style. *Virus Genes* 1999;21:51-64.
- López-Osorio S, Piedrahita D, Espinal-Restrepo MA, Ramírez-Nieto GC, Nair V, Williams SM, et al. Molecular characterization of Marek's disease virus in a poultry layer farm from Colombia. *Poultry Science* 2017;96(6):1598-1608.
- Lupiani B, Lee LF, Cui X, Gimeno I, Anderson A, Morgan RW, et al. Marek's disease virus-encoded Meq gene is involved in transformation of lymphocytes but is dispensable for replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004;32:11815-11820.
- Mohamed MHA, El-Sabagh IM, Al-Habeeb MA, Al-Hammady YM. Diversity of Meq gene from clinical Marek's disease virus infection in Saudi Arabia. *Veterinary World* 2016;9(6):572-578.
- McKimm-Beschkinn JL, Faragher JT, Withell J, Forsyth WM. Isolation of very virulent Marek's disease viruses from vaccinated chickens in Australia. *Australian Veterinary Journal* 1990;67:205-209.
- McPherson MC, Delany ME. Virus and host genomic, molecular, and cellular interactions during Marek's disease pathogenesis and oncogenesis. *Poultry Science* 2016;95(2):412-429.
- Murata S, Hashiguchi T, Hayashi Y, Yamamoto Y, Matsuyama-Kato Y, Takasaki S, et al. Characterization of Meq proteins from field isolates of Marek's disease virus in Japan. *Infection Genetics and Evolution* 2013;16:137-143.
- Nair V. Evolution of Marek's disease- A paradigm for incessant race between the pathogen and the host. *Veterinary Journal* 2005;170:175-183.
- Nair V. Latency and tumorigenesis in Marek's disease. *Avian Diseases* 2013;57:360-365.
- Nazerian K, Solomon JJ, Witter RL, Burmester BR. Studies on the etiology of Marek's disease. II. Finding of a herpesvirus in cell culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1968;127(1):177-182.
- Nikura M, Dodgson J, Cheng H. Direct evidence of host genome acquisition by the alphaherpesvirus Marek's disease virus. *Archives Virology* 2006;151:537-549.
- OIE. Marek's disease in OIE terrestrial manual [cited 2018 Ago 12]. Paris; 2016. Available from: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Healthstandards/tahm/2.03.13MAREK_DIS.pdf.
- Okazaki W, Purchase HG, Burmester BR. Vaccination against Marek's disease: possible causes of failure of herpesvirus of turkeys (Strain FC-126) to protect chickens against Marek's disease. *American Journal of Veterinary Research* 1973;34:813-817.
- Osterrieder N, Kamil JB, Schumacher D, Tischer BK, Trapp S. Marek's disease virus from miasma to model. *Nature Reviews Microbiology* 2006;4(4):283.
- Parcells MS, Anderson AS, Morgan TW. Retention of oncogenicity by a Marek's disease virus mutant lacking six unique short region genes. *Journal of Virology* 1995;69(12):7888-7898.
- Parcells MS, Anumugaswami V, Pigge JT, Pandya K, Dienglewicz RL. Marek's disease virus reactivation from latency: changes in gene expression at the origin of replication. *Poultry Science* 2003;82(6):893-898.
- Powell PC, Lombardini F. Marek's disease: a worldwide problem. *World's Poultry Science* 1986;42:205-218.
- Read AF, Baigent SJ, Powers C, Kgosana LB, Blackwell L, Smith LP, et al. Imperfect vaccination can enhance the transmission of highly virulent pathogens. *PLoS Biology* 2015;13(7):198-200.
- Rispens BH, Van Vloten H, Mastenbroek N, Maas HJ, Schat KA. Control of Marek's disease in the Netherlands. I. Isolation of an avirulent Marek's disease virus (strain CVI 988) and its use in laboratory vaccination trials. *Avian Diseases* 1972;16:108-125.
- Ross LJN. Recombinant vaccines against Marek's disease. *Avian Pathology* 1999;27:65-73.
- Saitou N, Nei N. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 1987;4:406-425.
- Schat KA, Calnek BW. Characterization of an apparently nononcogenic Marek's disease virus. *Journal of the National Cancer Institute* 1978;60:1075-1082.
- Schat KA, Calnek BW, Fabricant J, Abplanalp H. Influence of oncogenicity of Marek's disease virus on evaluation of genetic resistance. *Poultry Science* 1981;60(12):2559-2566.
- Shamblin CE, Greene N, Anumugaswami V, Dienglewicz RL, Parcells MS. Comparative analysis of Marek's disease virus (MDV) glycoprotein-lytic antigen gp38- and transformation antigen Meq-encoding genes: association of meq mutations with MDVs of high virulence. *Veterinary Microbiology* 2004;102:147-167.
- Silva RF, Dunn JR, Cheng HH, Nikura M. A MEQ-deleted Marek's disease virus cloned as a bacterial artificial chromosome is a highly efficacious vaccine. *Avian Diseases* 2010;54(2):862-869.
- Silveira P, Marin SY, Moreira PA, Tocantins BB, Lacorte G, Paixão TA, et al. Interactions of *Plasmodium juxtandere* and chicken anaemia virus: establishing a model. *Parasitology* 2013;1:1-12.
- Smith J. Superinfection drives virulence evolution in experimental populations of bacteria and plasmids. *Evolution* 2011;65(3):831-841.
- Solomon JJ, Witter RL, Nazerian K, Burmester BR. Studies on the etiology of Marek's disease. I. Propagation of the agent in cell culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1968;127(1):173-177.
- Sousa E. Registro da doença de Marek, Leucose aviária e doença infecciosa da bolsa na Região do Triângulo Mineiro, no período de 1999 a 2003. *PUBVET* 2010;4:27.
- Sung HW. Recent increase of Marek's disease in Korea related to the virulence increase of the virus. *Avian Diseases* 2002;46:517-524.
- Teng LQ, Wei P, Song ZB, He JJ, Cui ZZ. Molecular epidemiological investigation of Marek's disease virus from Guangxi, China. *Archives of Virology* 2011;156:203-206.
- Trapp S. A virus-encoded telomerase RNA promotes malignant T cell lymphomagenesis. *The Journal of Experimental Medicine* 2006;203:1307-1317.
- Wajid SJ, Katz ME, Renz KG, Walkden-Brown SW. Prevalence of Marek's disease virus in different chicken populations in Iraq and indicative virulence based on sequence variation in the EcoRI-Q (meq) gene. *Avian Diseases* 2013;57(2s1):562-568.
- Witter RL, Schat KA. Marek's disease. In: Saif Y M, Barnes H J, Fadly A M, Glisson J R, McDougald L R, Swayne E, editors. *Diseases of poultry*. 11th ed. Ames: Iowa State University Press; 2003. p.407-465.
- Witter RL. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Diseases* 1997;41:149-163.
- Witter RL, Nazerian K, Purchase HG, Burgoyne GH. Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus. *American Journal of Veterinary Research* 1970;31:525-538.
- Witter RL, Calnek BW, Buscaglia C, Gimeno IM, Schat KA. Classification of Marek's disease viruses according to pathotype: philosophy and methodology. *Avian Pathology* 2005;34(2):75-90.

Torres ACD, Marin SY,
Costa CS, Martins NRS



An Overview on Marek's Disease Virus Evolution and Evidence for Increased Virulence in Brazil

- Witter RL, Schar KA. Marek's diseases. In: Saif YM, editor. Diseases of poultry. Ames: Blackwell Publishing; 2003. chapter 15, p.407-465.
- Woźniakowski G, Samorek-Salamonowicz E, Kozdrub W. Sequence analysis of meq oncogene among Polish strains of Marek's disease. Polish Journal of Veterinary Sciences 2010;13:263.
- Woźniakowski G, Samorek-Salamonowicz E, Kozdrub W. Molecular characteristics of Polish field strains of Marek's disease herpesvirus isolated from vaccinated chickens. Acta Veterinaria Scandinavica 2011;53(1):10.
- Woźniakowski G, Samorek-Salamonowicz E. Molecular evolution of Marek's disease virus (MDV) field strains in a 40-year time period. Avian Diseases 2014;58(4):550-557.
- Yu ZH, Feng M, Luo J, Wang XW, Ding K, Yu LL, et al. Molecular characteristics and evolutionary analysis of field Marek's disease virus prevalent in vaccinated chicken flocks in recent years in China. Virus Genes 2013;47:282-291.
- Zanello A, Dall'ara P, Lavazza A, Marchi R, Morena MA, Rampin T. Interaction between Marek's disease virus and chicken infectious anemia virus. In: Schar KA, Morgan RM, Parcells MS, Spencer JL, editors. Current progress on Marek's disease research. Kennett Square: American Association of Avian Pathologists; 2001. p.1119.
- Zhang Y-p, Chang-jun L, Feng Z, Weisong S, Jingmei L. Sequence analysis of the Meq gene in the predominant Marek's disease virus strains isolated in China during 2006-2008. Virus Genes 2011;43(3):353.
- Zhang YP, Li ZJ, Bao KY, Lv HC, Gao YL, Gao HL, et al. Pathogenic characteristics of Marek's disease virus field strains prevalent in China and the effectiveness of existing vaccines against them. Veterinary Microbiology 2015;177(1-2):62-68.

ANEXO 2

Case Report

Under construction

Marek's disease virus natural co-infections

Ana Caroline Doyle Torres¹, Sandra Yuliet Marín Gómez¹, Camila Siqueira Costa, Natália Siqueira D'Aparecida¹, Mauricio Resende¹, Nelson Rodrigo da Silva Martins¹

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, Brazil.

Abstract

Employing PCR for the investigation of free-range (n=211 flocks) or industrial chickens (n=28 flocks) suspect of Marek's disease (MD), the MD virus (MDV, *Meq* gene) was found in 39.3% of poultry industry (layer) or 63.4% of free range chicken flocks. Considering the free-range chickens, MDV was detected in co-infection with *Mycoplasma gallisepticum* (Mg, *mgc2* gene) in 49% of flocks, with *Avibacterium paragallinarum* (Ap, *hpg-2* gene) in 20.5%, with *Chlamydia psittaci* (Cp, *ompA* gene) in 16% or with chicken infectious anemia virus (CAV, *vp1* gene) in two flocks (1.8%). Triple infections, MDV-Mg-Cp (10.7%), MDV-Mg-Ap (9%), MDV-Ap-Cp (0.9%, one flock), or one flock with quadruple detection of MDV-Mg-CAV-Cp, were also found. In the industrial chickens, MDV-Mg coinfection was detected in 17.8% of flocks, MDV-Ap in 10.7% and MDV-Mg-Ap in 7% of flocks. Very virulent MDV strains were detected in both types of chickens and the complexity of co-infections may perpetuate a diversity of pathogens and provide conditions for evolving advantages of potentially more virulent pathogens.

Keywords: Chicken, Marek's disease virus, *Mycoplasma gallisepticum*, *Avibacterium paragallinarum*, *Chlamydia psittaci*, chicken anemia virus.

¹ Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

Introduction

In the poultry industry, due to the high numbers of birds in confinement, disease outbreaks are rarely caused by a single etiology (Couto et al., 2016; Witter & Schat, 2003), requiring the diagnosis of the concomitant infections for adopting the adequate preventive or therapeutic strategy. Previous studies have indicated that the concomitant infections, especially with immunosuppressing etiologies, might interfere negatively on the efficiency of vaccination against Marek's disease (MD) (Haridy *et al.*, 2009). MDV *EcoR1* Q restriction fragment was designated *Meq* (JONES et al., 1992) and encodes a 339 amino acid phosphoprotein, expressed during the lytic and latent phases of infection (Gennart et al., 2015), involved in the activation of transcription and transformation of T lymphocytes (Gennart et al., 2015; Brown et al., 2009) and its sequencing may enable MDV preliminary characterization. Very soon after the adoption of the HVT (Witter et al., 1970) as vaccine strain, the possibility of variant MDV strains not protected by HVT vaccination was proposed (Okazaki et al., 1973) and highly oncogenic strains were subsequently isolated (Eidson et al., 1978). Latent infection of high number of lymphocytes was enabled in HVT- vaccinated RB-1B-challenged chickens, and could determine high future risk of tumor development if subject to immunological impairment by stress factors (e.g., egg production) or infections (CAV, etc.).

Increasingly more virulent MDV strains demanded characterization into very virulent (vv)MDV isolates, which may cause more severe MD lesions in HVT-vaccinated than a conventionally virulent (v)MDV isolate (Witter, 1997). Considering the potential role of co-infections on the evolutionary advantage of local pathogens, we preliminarily investigate and characterize MDV in co-infections with selected pathogens, in MD clinically affected free-range or industrial layer chickens.

Materials and Methods

Chicken flocks (n= 211) representing different origins of the State of Minas Gerais were admitted to the Laboratory of Avian Diseases (Escola de Veterinária, UFMG, Brazil) in reason of leg paralysis, chronic wasting, respiratory or other disease, within the period of 2008 to 2016. Chickens were of subsistence (n=183) or industrial layer flocks (n=28). The

biological samples were investigated for the presence of Marek's disease virus (MDV), *Avibacterium paragallinarum* (Ap), chicken anemia virus (CAV), *Chlamydia psittaci* (Cp) and *Mycoplasma gallisepticum* (Mg). Tissue samples (MDV: skin, thymus, spleen, liver, sciatic nerve, brachial nerve, trigeminal nerve and bursa of *Fabricius*; CAV: thymus, spleen and liver; Ap, Cp and Mg: trachea and lung) were collected at necropsy. The total tissue DNA extraction was performed using silicon dioxide and sodium iodide (Boom *et al.*, 1990; Vogelstein and Gillespie, 1979), with modifications as follows. Macerated tissue supernatant fluid (200 μ L) was mixed with 700 μ L of 6 M sodium iodide (NaI) at heat (55 °C), centrifuged (3,500xg/3min) and the supernatant added with 40 μ L of silicon dioxide suspension and mixed for 15 minutes. The silica-DNA pellet was washed (ethanol 60%, 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 8.0), centrifuged and added with 1 mL of acetone, evaporated and added with 80 μ L of TE 1X (5 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 8.0), for the elution of the DNA. The DNA quality and purity was evaluated at 260-280 nm (NanoVue®, GE Healthcare, UK) and samples were stored frozen (-20°C). The thermal extraction was performed as described previously (OIE, 2008).

The primer sequences and PCR conditions to MDV *Meq* gene 5'-TGTTGCGGATCCTCGGTAAGA-3' and 5'-AGTTGGCTTGTCATGAGCCAG-3'(583–763 bp product; Murata *et al.*, 2013), Mg *mgc2* gene 5'-GAGCTAATCTGTAAAGTTGGTC-3' and 5'-GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC-3' (185 bp; OIE, 2008), Ap *hpg-2* gene 5'-TGAGGGTAGTCTTGCACGCGAAT-3' 5'-CAAGGTATCGATCGTCTCTCTACT-3' (500 bp; Chen *et al.*, 1996), Cp *ompA* gene 5'-ACTACGGAGATTATGTTTTTCGATCGTG-3' and 5'-CGTGCACCTACGCTCCAAGA-3' (418 bp; Sachse *et al.*, 2009a) and CAV *vp1* gene 5'-GACTGTTAAGATGGCAAGACGAGC-3 and 5'-GGCTGAAGGATCCCTCCATT-3'(692 bp; Todd *et al.*, 1992) were previously described.

MDV evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Tamura *et al.*, 2004). The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method (Tamura *et al.*, 2011). The analysis involved 26 nucleotide sequences each with 354 nucleotides in the final dataset and the evolutionary analyses were conducted in MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

Results and Discussion

Virulent and very virulent MDV strains were detected in industrial layer and subsistence chicken flocks. Out of 211 tested flocks, 112 (112/211; 53%) were positive for *Meq* gene, both of the poultry industry (11/28; 39.3%) and of subsistence (116/183; 63.4%) poultry.

Concurrent etiologies were detected along with MDV in 67% of the MDV *Meq* positive flocks. In free-range flocks, MDV was co-detected with Mg *mgc-2* in 49% of flocks, with Ap in 20.5% (mostly clinically affected - infectious coryza), with Cp in 16% and with CAV in 1.8%. Triple detections, MDV, Mg and Cp in 10.7% of flocks, or MDV, Mg and Ap in 9%, or MDV, Ap and Cp in one flock (0.9%). Considering chickens of the poultry industry (layers), MDV was detected in 11/28 (39.3%), with co-detection MDV/Mg (5/28; 17.8%), MDV/Ap (3/28; 10.7%), and triple detection MDV/Mg/Ap in two chickens (7%). In industrial layer chickens, MDV as not detected in co-infection with CAV nor Cp.

A preliminary phylogeny of MDV strains based on *Meq* sequences found in free-range and industrial chickens in Minas Gerais was determined (Figure 1). The evolutionary relationships of Marek's disease virus strains of industrial or free-range chickens showed that nearly all isolates presented identity with the vvMDV strains from China, Hungary and of the USA. Strain 590 (KY322687) grouped with the vv+MDV strain 686 of Arkansas (AY362727).

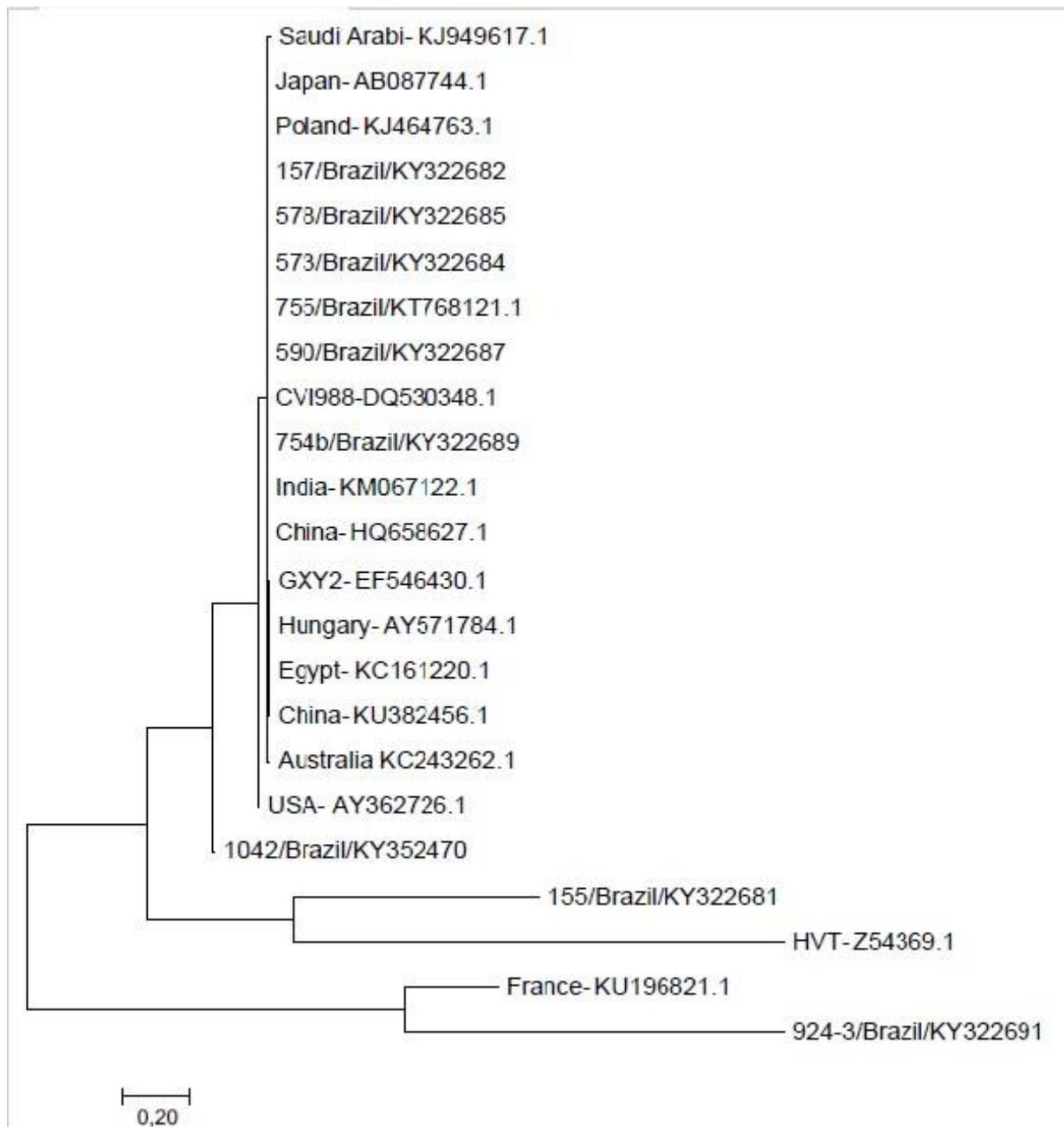


Figure 1. Evolutionary relationships of Marek's disease virus strains of industrial or free-range chickens as based on sequences of *Meq* gene.

All sequences obtained in this study are indicated as from Brazil. Identities were found to strains with various degrees of pathogenicity, from mild to very virulent, described in Africa, Asia, Europe, North America and Oceania. The phylogenetic analysis revealed a significant genetic diversity of MDV in Minas Gerais. However, strains 155 (Accession number KY322681), 157 (Accession number KY322682), 573 (Accession number

KY322684), 590 (Accession number KY322689), and 755 (Accession number KT768121.1) were considered conventionally virulent MDV (vMDV). The topology of the phylogenetic tree revealed that strain 924-3 (Accession number 322691), grouped with vMDV strain BC-1 (KU196821.1), with a significant genetic distance when compared to the other strains, and also characterized as vMDV. Strain 155 (KY was characterized as vMDV, although it was shown with a significant evolutionary distance when compared to the previously described virulent strains (GenBank), with a single mutation at position 176 of *Meq*. The external control strain included for comparisons was the herpesvirus of turkeys (HVT) FC126, and enabled the indication for high distance for strain 155. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method [Saitou and Nei, 1987]. The optimal tree with the sum of branch length = 5,66821085 is shown. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method [Tamura et al., 2004] and are in the units of the number of base substitutions per site. The analysis involved 13 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 353 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 [Kumar et al., 2016].

Hassanin; Abdallah; El-Araby (2013) observed that isolates from Egypt showed deduced amino acid substitutions in *Meq* protein at positions 71, 80, 112, 139 and 176, as verified in our study. Teng et al. (2011) observed that the major amino acid mutation points in the *Meq* protein of MDV strains from China occurred at positions 71, 77, 80, 115, 139, 176 and 217, with substitutions at positions 139, 176 and 217, as observed with local isolates. However, no previous sequences of Brazilian isolates have been published and no data was available for comparisons.

Considering strain 754b (KY322689), the *Meq* product was found non-functional, due to amino acid substitutions (139/Threonine, 155/Serine, 320/Cysteine, 326/Arginine). Strains 172 and 578 grouped together, and strains 500, 573, 578, 583 and 754b branched separate, the latter close to vvMDV strain GXY2 (EF546430) of China. Strains 155, 184 and 607 branched separate and close to vv+MDV strain W described in Delaware (AY362723) and

the vvMDV strain Egypt1 (JX467678). Strains 732 branched separate and close to vMDV strain GA (AF147806.2) and the RB-1B vvMDV strain (EF523390).

Strains 155 (mutation of residues 112/R, 115/L, 119/P, 139/G, 153/Y, 176/P, 276/T, 283/S, 320/S and 326/K) and 184 (112/R, 115/L, 119/P, 139/T, 153/S, 174/T, 217/P, 276/T, and 283/R) had the highest numbers of amino acid substitutions in *Meq*.

Strains 500 (KY322683) (Fig. 2), 754b (KY322689) and 755 (KT768121.1) caused severe peripheral nerve inflammatory disease in free-range chickens. The deduced amino acid substitutions in *Meq* protein of Egyptian isolates occurred at positions 71, 80, 112, 139 and 176 (Hassanin et al., 2013), and most mutations were found in strains 155 and 184. Teng et al. (2011) observed that the major amino acid substitutions in *Meq* occurred at positions 71, 77, 80, 115, 139, 176 and 217 in China, results also found with the local isolates, except for residue 80. However, no previous sequences of Brazilian isolates have been published and no data was available for comparisons.

The rate of detection of MDV is in partial agreement with findings by studies elsewhere, and provides a first overview on the occurrence of virulent MDV in both systems. A study of dust samples, collected from 2005 to 2011 in Australia, found an average of 26% of unvaccinated and 16% of vaccinated industrial flocks positive for virulent MDV-1. The quantitative PCR tests of the aviary dust were proposed for formulating Marek's disease vaccination strategies, as enabled the detection and quantitation of MDV-1, HVT, and MDV-2 strains in poultry houses (Walkden-Brown et al., 2013). In our studies, the occurrence of virulent MDV was also higher in free-range flocks.

Vaccination failure was attributed to the infection with CAV (Buscaglia & Crosetti, 1993), although the inadequate handling of the vaccine was implicated in The Netherlands (Landman & Verschuren, 2003). The increase on the occurrence of Marek's disease in vaccinated chickens in Argentina in the beginning of the 1990's, however, was associated, in addition to vaccination errors, including subdosage (Buscaglia & Crosetti, 1993), also to MDV genetic changes to increased virulence (vvMDV) (Buscaglia et al., 1995).

However, non-uniform protection of flocks would enable sufficient MDV replication to generate diversity. The controversy exists, as the more virulent strains would kill and have limited transmission but would gain an edge on partially protected chickens, enabling

transmission and increasing environmental risk (Baigent et al., 2013; Read et al., 2015). The presence of MDV in dust correlated with feather tips replication, both chronologically and quantitatively, and pCVI988 and HVT+SB-1 strains vaccines had most efficiently reduced challenge virus (Md5) replication and excretion (Baigent et al., 2013).

A surprising outcome in MDV vaccinated flocks has been described, as vaccinated chickens challenged with a highly virulent strain have lived longer and produced transmission to unvaccinated chickens housed together, resulting in precocious death of the challenged birds. Immunity could enable the transmission of viruses of otherwise little transmissibility, providing an evolving advantage to greater virulence (Read et al., 2015). The selective pressure to greater virulence is considered to be accelerated mainly by the immune responses induced by vaccination (Witter, 1997; Davison & Nair, 2005; Read et al., 2015), in which evasive mutants may become the dominant genotypes (Shamblin et al., 2004; Nikura et al., 2006), with evolutive advantage associated to the expression of the cell transforming *Meq* gene (Teng et al., 2011). Although vaccine failure may be associated to the emergence of clinical MD (Gimeno et al., 2011) and possibly the imperfect immunity may also have a major role for the emergence of mutants in vaccinated flocks (Read et al., 2015).

MDV was shown to occur in unvaccinated free-range or industrial chickens in Iraq, although with minor genetic variation in *Meq* (two four-proline repeats) which indicated vvMDV (Islam et al., 2013). The simultaneous co-detections of MDV with three subgroups of avian leukosis virus (A, B or J), reticuloendotheliosis virus (REV), infectious bursal disease virus, avian reovirus and chicken infectious anemia viruses have been documented (Zeng et al., 2015) using a GeXP-multiplex PCR. MDV-REV co-infection will increase the severity of MD disease, and reduce the efficacy of vaccination (Sun et al., 2017).

The poultry health legislation in Brazil is determined by the Poultry Health National Program [Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA)], as based on the recommendations by the World Association for Animal Health (OIE, 2008). Mycoplasmoses by *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, both in chickens and turkeys, and *M. meleagridis* in turkeys, are eradicated from the breeding flocks of poultry industry, for the conformity to OIE and World Trade Organization (WTO) (Brasil, 2001). Preventive measures must consider biosecurity for any type of flock, and biosecurity is mandatory by

the PNSA for the industrial breeding flocks (Brasil, 2009). Indeed, outbreaks of disease in chickens and turkeys originating from free-range chickens involving *Mycoplasma gallisepticum* have been described in North Carolina, USA (Luttrell et al., 2001; Schlundt, 2001).

A diversity of pathogens was detected in co-infection and the epidemiological role for each pathogen should be considered. The Brazilian layer industry prevents major respiratory problems through vaccination, such as against *Avibacterium paragallinarum*, infectious bronchitis virus (IBV) and *Mycoplasma gallisepticum*. However, multiple respiratory etiologies are considered common, including *A. paragallinarum*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma spp.*, and IBV, and in two outbreak areas, infectious laryngotracheitis virus (Couto et al., 2016).

Scarce scientific information is available on MDV in free-range or industrial poultry in Brazil. In our laboratory routine experience, the classical form of Marek's disease is a condition commonly found in subsistence chickens. In addition to MDV, we have diagnosed the association of MDV, CAV, *M. gallisepticum*, *C. psittaci* or *A. paragallinarum*. Considering immunodepression, MDV/CAV coinfection may additionally impair the immune response and increase the susceptibility to the prevalent or reemerging infections.

Graver clinicopathological effects in chickens were described for the coinfection of CAV and Mg vaccine strains of CAV (Cuxhaven-1) and *M. gallisepticum* (F) (Prezotto et al., 2016). The synergic pathological effect of CAV in chickens was also described with *Plasmodium juxtannucleare* (Silveira et al., 2013). The simultaneous co-infection with MDV and CAV in broilers above three weeks of age seems to represent a common condition in different countries (Otaki et al, 1987; Zanella et al, 2001; Morrow & Fehler, 2004; Davidson et al, 2004), and the negative association has been demonstrated (Miles et al., 2001; Haridy et al., 2009; Haridy et al., 2012). The loss or deficient activity of T-cytotoxic lymphocytes may have a role in the severity of CAV infection with different pathogens (Markowski- Grimsrud & Schat, 2003), and may enable a more intensively replicating population of pathogens, potentially increasing the transmission risk from flock to flock.

The detection of *Chlamydia psittaci*, as coinfection with MDV in 16% of the free-range chickens requires further analysis of the epidemiological significance, as genotypes will vary

in pathogenicity. Considering the genotypes previously found in chickens, genotype D will cause more severe disease, including mortality in chickens and turkeys, as compared to the milder genotype B (Vanrompay et al., 1993; Yin *et al.*, 2013). A local previous study in native psittacines in triage revealed the occurrence of *C. psittaci* genotype A (Vilela, 2012). Although broiler processing plants should be considered an activity of risk for humans (Yin *et al.*, 2013), and that no detection was found in industrial chickens, the focus should be on the role of free-range chickens in the epidemiology of Cp in humans and other animals, including domestic and wild, especially in birds. Wild psittacines are considered reservoirs of *C. psittaci*. In South Korea, a study of 225 samples from wild birds (2016) revealed 1.8% and 0.9% positive for *Chlamydia psittaci* or *Chlamydia gallinacea*, respectively. The phylogenetic analyses of the *ompA* gene showed the occurrence of previously known genotypes E, 1V and 6N of *C. psittaci*, whereas the *C. gallinacea* strains were classified as new variants (Jeong et al., 2017). European isolates were genetically characterized based on the polymorphism of restriction fragments (*ompA*) and results revealed a new genotype E/B present in several countries (Geens et al., 2005).

Virulence evolution in bacteria was shown to be driven by competition among microbiota within the host. As plasmids have evolved to severely reduce host fitness, the trade-off hypothesis was considered inconsistent. The trade-off hypothesis predicts that pathogens vertically transmitted would evolve to lower virulence and virulence was associated with superinfection of bacteria containing more competitive plasmid genotypes. As more virulent (invasive) genotypes have become more abundant, the host would develop resistance, through immune system mediators. In addition, the symbiosis of the bacterial microbiota within the host was shown to provide initial antagonism (Smith, 2011). Such condition would also apply for viruses, as for herpes simplex virus (HSV) persistently infected cells, the equilibrium of cell-virus interaction is genetically determined and would result in increased virulence and cellular resistance during persistence (Cummings & Rinaldo, 1989), possibly applicable locally to MDV and its co-infections.

MDV was co-detected with very important pathogens of chickens, both in industry (layer) and free-range chickens. However, very relevant pathogens were not included in the study and should provided valuable and more detailed information about the overall picture, such as IBV, infectious bursal disease virus, among others. The potential role of subsistence

chickens as reservoirs of relevant pathogens is cause for concern, despite very important associations also found in the layer industry. Considering infections in both types of chickens, the concern is also extensive to native avian conservation, as pathogens would spill over to avifauna (Luttrell et al., 2001). The association of infections might represent an evolutionary advantage for each of the etiologies, possibly resulting in an opportunity for increased virulence.

Acknowledgements

The authors are indebted to CAPES, CNPq and FAPEMIG for financial support and scholarships.

References

- Boom R., C.J. Sol, M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M. Wertheim-van Dillen, and J. van der Noordaa. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28(3), p.495-503, 1990.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução normativa nº 44 de 23 de agosto de 2001. Aprova as normas técnicas para o controle e a certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas para a Micoplasmose Aviária (*Mycoplasma gallisepticum*, *synoviae* e *melleagridis*). Diário Oficial da União. Brasília, DF, p. 68-70, de 24 de ago. de 2001, Seção I, 2001.
- Brasil. Manual de Legislação. Programas Nacionais de Saúde Animal do Brasil. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF, 2009.
- Brown, A.C., L.P. Smith, L. Kgosana, S.J. Baigent, V. Nair, and M.J. Allday. Homodimerization of the *Meq* Viral Oncoprotein Is Necessary for Induction of T-Cell Lymphoma by Marek's Disease Virus. *Journal of Virology*, v.83, n.21, p.11142-11151, 2009.
- Buscaglia C. and C. Crosetti. Studies on Marek's disease vaccination failures in Argentina. 4th International Symposium on Marek's Disease and Proceedings of 2nd Meeting on the Cooperative Research Project in the Area of Veterinary Sciences between National University of La Plata and Japan International Cooperation Agency. La Plata, Argentina, p. 19-21, 1993.
- Buscaglia, C., P. Nervi, J.L. Garbi, and M. Piscopo. Isolation of very virulent strains of Marek's disease virus from vaccinated chickens in Argentina. In Western Poultry Disease Conference (USA), 1995.
- Chen X., J.K. Miflin, P. Zang, and P.J. Blackall. Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Diseases*, v.40(2), p.398-407, 1996.

- Couto, R.M., J.F.V. Braga, S.Y. Marin, M. Resende, N.R.S. Martins, and R. Ecco. Natural concurrent infections associated with infectious laryngotracheitis in layer chickens. *Journal of Applied Poultry Research (Print)*, v. 25, p. 113-128, 2016.
- Cummings P.J., and C.R. Rinaldo Jr. Coevolution of Virulent Virus and Resistant Cells as a Mechanism of Persistence of Herpes Simplex Virus Type 1 in a Human T Lymphoblastoid Cell Line *J. gen. Virol.* 70, 97-106, 1989.
- Davidson I, M. Kedem, H. Borochoviz, N. Kass, G. Ayali, and E. Hamzani. Chicken infectious anemia virus infection in Israeli commercial flocks: virus amplification, clinical signs, performance, and antibody status. *Avian Diseases*, v.48, p.108-118, 2004.
- Davison, F., and V. Nair. Use of Marek's disease vaccines: could they be driving the virus to increasing virulence? *Expert review of vaccines*, v. 4, n. 1, p. 77-88, 2005.
- Eidson, C.S., P.K. Page, and S.H. Kleven. Effectiveness of cell-free or cell-associated turkey herpesvirus vaccine against Marek's disease in chickens as influenced by maternal antibody, vaccine dose and time of exposure to Marek's disease virus. *Avian Diseases*, 22, 583-597, 1978.
- Geens, T., A Desplanques, M. Van Loock, B.M. Bonner, E.F. Kaleta, S. Magnino, A.A. Andersen, K.D.E. Everett, and D. Vanrompay. Sequencing of the *Chlamydophila psittaci* ompA Gene Reveals a New Genotype, E/B, and the Need for a Rapid Discriminatory Genotyping Method. *J. Clin. Microbiol.* May 2005. 43 no. 5 2456-2461, 2005.
- Gennart, I., D. Coupeau, S. Pejakovic', S. Laurent, D. Rasschaert, B. Muylkens. Marek's disease: Genetic regulation of Gallid herpesvirus 2 infection and latency. *The Veterinary Journal*, v.205, p.339-348, 2015.
- Gimeno, I.M.; A.L. Cortes, E.R. Montiel, S. Lemiere, and A.K. Pandiri. Effect of diluting Marek's disease vaccines on the outcomes of Marek's disease virus infection when challenged with highly virulent Marek's disease viruses. *Avian Diseases*, v.55, n. 2, p.263- 272, 2011.
- Haridy M, M. Goryo, J. Sasaki, K. and Okada. Pathological and immunohistochemical study of chickens with coinfection of Marek's disease virus and chicken anaemia virus. *Avian Pathology*, v.38, p.469-483, 2009.
- Haridy M., J. Sasaki, K. Okada, and M. Goryo. Persistence of inclusions and antigens of chicken anemia virus in Marek's disease lymphoma. *Reserch in Veterinary Science*, v.93, p.1353-1360, 2012.
- Hassanin O., F. Abdallah, and I.E. El-Araby. Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Marek's Disease Virus from Clinical Cases of Marek's Disease in Egypt. *Avian Diseases*, v.57, p.555-561, 2013.
- Jeong J., I. An, J.-K. Oem, S.-J. Wang, Y. Kim, J. -H. Shin, C. Woo, Y. Kim, S. -J. Jo, K. Son, S. Lee, . and Jheong. (2017). Molecular prevalence and genotyping of *Chlamydia* spp. in wild birds from South Korea. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v.79(7), p.1204-1209. <http://doi.org/10.1292/jvms.16-0516>.
- Jones D, L. Lee, J.L. Liu, H.J. Kung and J.K. Tillotson. Marek disease virus encodes a basic-leucine zipper gene resembling the fos/jun oncogenes that is highly expressed in

- lymphoblastoid tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v.89(9), p.4042-4046, 1992.
- Kumar S., G. Stecher, and K. Tamura. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, v.33, 1870-1874, 2016.
- Landman W J, Verschuren S B. Titration of Marek's disease cell-associated vaccine virus (CVI 988) of reconstituted vaccine and vaccine ampoules from Dutch hatcheries. *Avian Diseases*, v.47, p.1458-1465, 2003.
- Luttrell M.P., D.E. Stallknecht, S.H. Kleven, D.M. Kavanaugh, J.L. Corn, and J.R. Fischer. *Mycoplasma gallisepticum* in house finches (*Carpodacus mexicanus*) and other wild birds associated with poultry production facilities. *Avian Diseases*, v. 45, n. 2, p. 321-329, 2001.
- Markowski-Grimsrud C J, and K.A. Schat. Infection with chicken anaemia virus impairs the generation of pathogen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Immunology*, v.109, p.283-294, 2003.
- Miles A M, S.M. Reddy, and R.W. Morgan. Coinfection of specific-pathogen-free chickens with Marek's disease virus (MDV) and chicken infectious anemia virus: effect of MDV pathotype. *Avian Diseases*, v.45, p. 9-18, 2001.
- Morrow C, and F. Fehler. Marek's disease: a worldwide problem. In: DAVISON, F.; NAIR, V. (Eds.), *Marek's Disease: An Evolving Problem*, 1st edn, p. 49-61, 2004.
- Murata S, T. Hashiguchi, Y. Hayashi, Y. Yamamoto, Y. Matsuyama-Kato, S. Takasaki, M. Isezaki, M. Onuma, S. Konnai, and K. Ohashi. Characterization of *Meq* proteins from field isolates of Marek's disease virus in Japan. *Infection, Genetics and Evolution*, v.16, p. 137-143, 2013.
- Nikura, M., J. Dodgson, and H. Cheng, Direct evidence of host genome acquisition by the alphaherpesvirus Marek's disease virus. *Archives Virology*, v.151, p.537-549, 2006.
- OIE- Office International des Epizooties. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.3.5. Avian Mycoplasmosis. (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*), 6. ed., Paris, p. 482-496, 2008.
- Okazaki, W., H.G. Purchase, H.G. and B.R. Burmester. Vaccination against Marek's disease: Possible causes of failure of herpesvirus of turkeys (Strain FC-126) to protect chickens against Marek's disease. *American Journal of Veterinary Research*, 34: 813-817, 1973.
- Otaki Y, T. Nunoya, M. Tajima, and Y. Nomura. Isolation of chicken anaemia agent and Marek's disease virus from chickens vaccinated with turkey herpesvirus and lesions induced in chicks by inoculating both agents. *Avian Pathology*, v.16, p.291-306, 1987.
- Prezotto C F, S. Y. Marin, T.S. Araújo, F.O. Barbosa, P.R. Barrios, A.M. Gomes, N.R.S. Martins. Experimental Coinfection of Chicken Anemia Virus and *Mycoplasma gallisepticum* Vaccine Strains in Broiler Chicks. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.18, p.475-480, 2016.
- Read, A.F., S.J. Baigent, C. Powers, L.B. Kgosana, L. Blackwell, L.P. Smith, D.A. Kennedy, S.W. Walkden-Brown, and V.K. Nair. Imperfect vaccination can enhance the transmission of highly virulent pathogens. *PLOS Biology*, v. 13, n. 7, p. 198- 200, 2015.

- Sachse K, K. Larocau, and F. Vorimore. DNA microarray genotyping of *Chlamydomphila psittaci* strains from culture and clinical samples. *Vet. Microbiol.*, v. 135, p. 22-30, 2009.
- Saitou N. and N. Nei. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425, 1987.
- Schlundt J. Emerging food-borne pathogens. *Biomedical Environment Science*, v.14, n.1-2, p.44-52, 2001.
- Shamblin, C.E., N. Greene, V. Arumugaswami, R.L. Dienglewicz, and M.S. Parcells. Comparative analysis of Marek's disease virus (MDV) glycoprotein-, lytic antigen pp38- and transformation antigen *Meq*-encoding genes: association of *Meq* mutations with MDVs of high virulence. *Veterinary Microbiology*, v.102, p.147-167, 2004.
- Silveira, P.; S.Y. Marin, P.A. Moreira, B.B. Tocantins, G. Lacorte, T.A. Paixão, N.R.S. Martins, É. M. Braga. Interactions of *Plasmodium juxtannucleare* and chicken anaemia virus: establishing a model. *Parasitology (London. Print)*, v. 1, p. 1-12, 2013.
- Smith, J. Superinfection drives virulence evolution in experimental populations of bacteria and plasmids. *Evolution; international journal of organic evolution*, v. 65(3), p.831-841, 2011.
- Sun G.R., Y.P. Zhang, L.Y. Zhou, H.C. Lv, F. Zhang, K. Li, Y.L. Gao, X.L. Qi, H.Y. Cui, Y.Q. Wang, L. Gao, Q. Pan, X.M. Wang, and C.J. Liu. Co-Infection with Marek's Disease Virus and Reticuloendotheliosis Virus Increases Illness Severity and Reduces Marek's Disease Vaccine Efficacy. *Viruses*, 21;9(6). pii: E158, 2017.
- Tamura K., M. Nei, and S. Kumar. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035, 2004.
- Tamura K,D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. v. 28(10), 2731-2739, 2011.
- Teng L.Q., P. Wei, Z.B. Song, J.J. He, and Z.Z. Cui. Molecular epidemiological investigation of Marek's disease virus from Guangxi, China. *Archives of virology*, v.156, p. 203-206, 2011.
- Todd D., K.A. Mawhinney, and M.S. McNulty. Detection and differentiation of chicken anemia virus isolates by using the polymerase chain reaction. *Journal Clinical Microbiology*, n.30, p. 1661-1666, 1992.
- Vanrompay D, R. Ducatelle, F. Haesebrouck, and W. Hendrickx. Primary pathogenicity of an European isolate of *Chlamydia psittaci* from turkey poults. *Vet Microbiol.*, v. 38(1-2), 103-113, 1993.
- Vilela, D.A.R. Diagnóstico de situação dos animais silvestres recebidos nos CETAS brasileiros e *Chlamydomphila psittaci* em papagaios (*Amazona aestiva*) no CETAS de Belo Horizonte, MG, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.
- Vogelstein, B., and D. Gillespie. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 76, No. 2, pp. 615-619, 1979.

Witter, R L, and K.A. Schat. Marek's disease. In SAIF Y M, Barnes H J, Fadly A M, Glisson J R, Mcdougald L R, Swayne E (ed) Diseases of Poultry, 11th ed. Iowa State University Press, Ames, IA, p.407-465, 2003.

Witter, R. L. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Diseases*, v.41, p.149–163, 1997.

Witter, R.L., K. Nazerian, H.G. Purchase, and G.H. Burgoyne. Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus. *American Journal of Veterinary Research*, 31: 525-538, 1970.

Yin, L, I.D. Kalmar, S. Lagae, S. Vandendriessche, W. Vanderhaeghen, P. Butaye, E. Cox, and D. Vanrompay. Emerging *Chlamydia psittaci* infections in the chicken industry and pathology of *Chlamydia psittaci* genotype B and D strains in specific pathogen free chickens. *Veterinary Microbiology*, v. 162, 2–4, p. 740-749, 2013.

Zanella A, P. Dall'ara, A. Lavazza, R. Marchi, M.A. Morena, and T. Rampin. Interaction between Marek's disease virus and chicken infectious anemia virus. In Schat K A, R.M. Morgan, M.S. Parcells, J.L. Spencer. editors. Current progress on Marek's disease research. Kennett Square: American Association of Avian Pathologists, p.1119, 2001.

ANEXO 3

Principais zoonoses bacterianas de aves domésticas e silvestres

Ana Caroline Doyle Torres
Dionei Joaquim Haas
Natália D'Aparecida Siqueira

RESUMO

A proximidade do ser humano com animais domésticos e silvestres aumenta a probabilidade de transmissão de doenças zoonóticas. Nesse contexto, destaca-se a relação entre o homem e as aves. Visto que as zoonoses bacterianas apresentam alto impacto na saúde pública, a necessidade de se conhecer os principais fatores de risco envolvidos na transmissão das bactérias aos humanos é de extrema importância. Com isso, esta revisão bibliográfica tem por finalidade contemplar as principais zoonoses bacterianas de aves domésticas e silvestres.

Palavras-chave: Bactérias. Saúde pública. Homem. Aves. Zoonoses.

Main bacterial zoonoses of domestic and wild birds

ABSTRACT

The proximity of humans with domestic or wild animals increases the probability of transmission of zoonotic diseases. Within this context, we highlight the relationship between man and birds. Since bacterial diseases have a high impact on public health, the need to know the main risk factors involved in the transmission of bacteria to humans is extremely important. Thus, this review is intended to include the major zoonotic bacterial diseases of domestic and wild birds.

Keywords: Bacteria. Public health. Human. Zoonoses. Birds.

INTRODUÇÃO

Devido ao maior contato dos animais domésticos e silvestres com o ser humano, a possibilidade da transmissão de patógenos bacterianos zoonóticos ao homem aumentou significativamente. Dentre esses animais, podemos destacar as aves, tanto as criadas em um sistema que vise à produção de carne e ovos quanto as de cativeiro e de vida livre. Esses animais podem ser portadores ou reservatórios de zoonoses com grande impacto na saúde pública. Perante esse contexto, objetivou-se, com esta revisão de literatura, proporcionar uma atualização acerca das principais zoonoses bacterianas aviárias de importância na área da saúde pública.

Ana Caroline Doyle Torres – Mestranda em Ciência Animal com ênfase em Doenças das Aves na Universidade Federal de Minas Gerais.

Dionei Joaquim Haas – Doutorando na Universidade Federal de Minas Gerais.

Natália D'Aparecida Siqueira – Residente em Saúde Pública com Ênfase em Interface Saúde Humana e Silvestre na Universidade Federal de Minas Gerais.

Veterinária em Foco	Canoas	v.14	n.1	p.47-59	jul./dez. 2016
---------------------	--------	------	-----	---------	----------------

DESENVOLVIMENTO

Arcobacteriose

As arcobacterioses são doenças emergentes transmitidas por alimentos contaminados com espécies do gênero *Arcobacter* spp., bastonetes Gram negativos curvos ou em forma de "S", semelhantes a *Campylobacter*, porém aerotolerantes (SNELLING et al., 2006). Quatro espécies de *Arcobacter* contaminam carcaças de frangos, sendo três enteropatógenos humanos emergentes, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* (VANDENBERG et al., 2004). *A. cibarius* tem sido recuperado da carne de frango, mas não de amostras humanas (HOUF et al., 2005). Muito recentemente *A. faecis* foi isolado de fezes humanas em uma fossa séptica (WHITEDUCK et al., 2015). No entanto, essa espécie ainda não foi associada a casos de infecção em humanos.

Arcobacter spp. coloniza o trato intestinal de várias espécies animais como, por exemplo, bovinos, suínos, ovinos e equinos. No entanto, as aves domésticas são possivelmente os principais reservatórios naturais desse microrganismo, pois são carreadores assintomáticos (LEHNER et al., 2005). Além disso, *Arcobacter* spp. pode ser encontrado em fontes de água superficiais e subterrâneas, sendo o esgoto uma importante fonte de infecção para o homem e os animais (ATABAY; WAINO; MADSEN, 2006).

A. butzleri é a espécie isolada com maior frequência de carne de frango (KABEYA et al., 2004), possivelmente por ser a espécie da família *Campylobacteriaceae* mais resistente à dessecação e a altas temperaturas como a escaldagem de carcaças de frangos por três minutos (OTTH; WILSON; FERNANDEZ, 2001; HO; LIPMAN; GAASTRA, 2008). A contaminação das carcaças por *Arcobacter* sp. ocorre durante o processamento da ave no abatedouro, em vários pontos da linha (HO; LIPMAN; GAASTRA, 2008).

A infecção por *Arcobacter* spp. no homem ocorre principalmente por via oral através de ingestão de água ou alimentos contaminados, como a carne de frango (HO; LIPMAN; GAASTRA, 2006). Outras possíveis formas de adquirir a infecção são a transmissão direta de uma pessoa para outra durante um surto (VANDAMME et al., 1992), contaminação de feridas e fistulas (HSUEH et al., 1997) e transmissão vertical/transplacentária ao feto (ON; STACEY; SMYTH, 1995).

A. butzleri, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* têm sido associados com doenças intestinais principalmente em crianças e pacientes idosos com doenças crônicas ou imunossuprimidos (MANSFIELD; FORSYTHE, 2000; HO; LIPMAN; GAASTRA 2006; COLLADO; FIGUERAS, 2011). *A. butzleri* também tem sido associado à "diarreia dos viajantes" adquirida por norte-americanos e europeus ao viajarem para o México, Guatemala e Índia (JIANG et al., 2010).

O principal sintoma decorrente da infecção por *Arcobacter* sp. é a diarreia aquosa persistente. Em muitos casos, a enterite clínica é autolimitante (HO; LIPMAN; GAASTRA, 2006). Outros sintomas incluem cólicas abdominais recorrentes sem diarreia, febre e bacteremia (COLLADO; FIGUERAS, 2011). A terapia para os casos mais brandos

da doença é baseada na hidratação e repouso, e, naqueles pacientes com sintomatologia prolongada e grave, são utilizados fluorquinolonas e tetraciclina.

Campilobacteriose

Campilobacteriose é uma doença de origem alimentar causada por bactérias do gênero *Campylobacter*, bastonetes Gram negativos curvos, microaerófilos e móveis a partir de flagelos polares e um típico movimento de “saca-rolhas” (DEBRUYNE; GEVERS; VANDAMME, 2008).

Campylobacter é uma das principais causas de diarreia aguda em humanos no mundo inteiro (KAAKOUSH et al., 2015). A campilobacteriose em seres humanos deve-se principalmente ao *Campylobacter jejuni* (cerca de 90% dos casos), sendo a porção restante causada predominantemente por *Campylobacter coli* (JANSSEN et al., 2008). *Campylobacter* é uma bactéria que faz parte da microbiota intestinal normal de aves, e os seres humanos não são reservatório para este microrganismo. Como resultado, as aves são carreadores assintomáticos, assim como a principal fonte da infecção (SILVA et al., 2011; HERMANS et al., 2012).

Bactérias do gênero *Campylobacter* são altamente infecciosas, e a doença no homem pode ser causada por uma dose infectante de apenas 500-800 células bacterianas (ROBINSON, 1981; BLACK et al., 1988). A rota mais importante das infecções por *Campylobacter* é o consumo e manuseio da carne de frango contaminada (ALLOS, 2001). A carcaça do frango geralmente contamina-se durante o processamento no abatedouro, especialmente no processo de evisceração, a partir do rompimento do trato intestinal e transferência das fezes contendo *Campylobacter* sp. para a pele da carcaça (SILVA et al., 2011).

Nos países em desenvolvimento, onde a doença está principalmente confinada a crianças, o contato com animais de fazenda é um importante fator de risco (BUTZLER, 2004). Muitas infecções são adquiridas por viajantes americanos e europeus em viagens a países em desenvolvimento (BUTZLER, 2004).

A campilobacteriose em humanos desenvolve-se tipicamente entre dois e cinco dias após a exposição à bactéria. No entanto, o período de incubação pode ser de até 10 dias. Os sintomas podem variar de uma diarreia aquosa autolimitante até uma disenteria sanguinolenta, com cólicas abdominais, náuseas, vômitos e febre (BLASER; ENGBERG, 2008), que podem persistir por até sete dias (SKARP; HÄNNINEN; RAUTELIN, 2016).

Em um baixo percentual de pacientes, a fase aguda é seguida por sequelas graves como a síndrome de Guillain-Barré, a causa mais comum de paralisia neuromuscular aguda no mundo (VUCIC; KIERNAN; CORNBLATH, 2009), artrite reativa (Síndrome de Reiter) (HANNU; MATTILA; RAUTELIN, 2002), problemas pulmonares, dermatológicos, intravasculares, renais, neurológicos e abortos (CRUSHELL et al., 2004). A prevenção da infecção é o cozimento adequado da carne de frango.

O tratamento da campilobacteriose humana é baseado no repouso e fluidoterapia, sendo recomendados antibióticos somente para os casos graves da doença (BLASER; ENGBERG, 2008).

Clamidiose

Chlamydothila psittaci é classificada como uma bactéria intracelular obrigatória, podendo vir a causar doença clínica em aves e mamíferos, incluindo o homem (ANDERSEN; VANROMPAY, 2003). Conhecida como psitacose, ornitose ou febre dos papagaios, atualmente o termo clamidiose é utilizado para denominar a enfermidade nas aves e psitacose para a dos seres humanos (REVOLLEDO; FERREIRA, 2009).

Esta doença é considerada como uma das principais zoonoses aviárias (PROENÇA; FAGLIARI; RASO, 2011). A clamidiose possui prevalência subestimada, devido ao diagnóstico definitivo difícil, em virtude da complexa fisiopatologia da infecção por *Chlamydothila psittaci* (RASO et al., 2004). A transmissão da *C. psittaci* ao homem, segundo Nasphv (2010), ocorre principalmente pela inalação do microrganismo presente em penas e fezes secas ou em secreção respiratória de aves infectadas. No entanto, a transmissão pode ocorrer também por meio de fômites ou vetores mecânicos, como ácaros e piolhos (LONGBOTTOM; COULTER, 2003). O período de incubação da *C. psittaci* em seres humanos é em média de cinco a 14 dias (CDC, 2000). As principais complicações incluem pericardite, endocardite ou miocardite, hepatomegalia e esplenomegalia. Casos fatais em humanos tornaram-se extremamente raros (cerca de 5%) desde o advento dos antibióticos (WEST, 2011).

Em aves, os achados de necropsia são inespecíficos e, além das lesões no sistema respiratório, caracterizadas por aerossaculite e pneumonia, encontram-se também alterações no coração, fígado e baço (LONGBOTTOM; COULTER, 2003). O período de incubação pode variar de dias a semanas, dependendo da espécie, da virulência do agente, da idade e da condição da ave (NASPHV, 2010). Os sinais clínicos da clamidiose podem variar em função da espécie, estado imunológico, idade, virulência do sorotipo envolvido, via de transmissão e eventual presença de infecções simultâneas (CUBAS et al., 2006).

O estresse causado por superpopulação, higiene precária, alimentação deficiente, alterações ambientais, transporte ou infecções concomitantes podem ativar uma infecção latente, resultando na manifestação clínica da doença (RASO, 2007). Aves portadoras assintomáticas apresentam períodos intermitentes de excreção de pequena quantidade da bactéria; a reativação da eliminação é favorecida por fatores como estresse, subnutrição, extremos de temperatura e cativeiro (HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009).

Segundo Telfer et al. (2005), o grupo de risco humano para a doença compreende pessoas que mantenham contato próximo com aves como, por exemplo, proprietários de aves de companhia, trabalhadores em criação de aves comerciais e/ou em linhas de

processamento de carne, indivíduos que trabalham em lojas que comercializam aves e médicos-veterinários. O potencial zoonótico das aves de companhia não se limita ao contato direto com elas e, desta forma, pode estar associado a atividades executadas no ambiente que elas ocupam, tais como jardinagem, podas de árvores e gramados, abrangendo assim, tanto o ambiente urbano quanto o rural (FENGA et al., 2007).

O diagnóstico de clamidiose pode ser realizado por meio de testes sorológicos, detecção de antígenos ou por meio de técnicas de biologia molecular (CDC, 2000). A tetraciclina e a eritromicina foram utilizadas durante décadas no tratamento das psitacoses. Com isso, esses antibióticos são utilizados em larga escala, o que indica que a resistência clínica a eles ainda não representa um grande problema (MCORIST, 2000).

Listeriose

Listeriose é uma doença grave que afeta principalmente as mulheres grávidas, recém-nascidos e adultos imunocomprometidos. O agente etiológico é a bactéria *Listeria monocytogenes*, um bastonete Gram negativo que ocorre ubiquamente na natureza e que pode ser isolado da cloaca e das fezes de aves assintomáticas (PETERSEN; MADSEN, 2000; NALÉRIO et al., 2009). Manifestações clínicas de listeriose em aves são raras, porém alguns casos têm sido relatados (CRESPO et al., 2013).

L. monocytogenes forma rapidamente biofilmes, é resistente a altas concentrações de sal e ácidos, podendo crescer em pH entre 6 e 9 e em temperaturas que variam de 1° a 45°C, o que acaba favorecendo a sobrevivência bacteriana por períodos prolongados em plantas de abate de aves e a contaminação da carcaça do frango. Além disso, podem multiplicar-se em alimentos refrigerados (SCHUCHAT; SWAMINATHAN; BROOME, 1991; SWAMINATHAN; GERNER, 2007).

A contaminação cruzada geralmente ocorre durante o processamento da ave no abatedouro (REITER et al., 2005; NALÉRIO et al., 2009). A prevalência de *L. monocytogenes* em carne crua de frango pode ser alta, variando entre 38-60% (JEMMI; STEPHAN, 2006). Um estudo realizado no Brasil encontrou *L. monocytogenes* em 11.7% das carcaças de frango provenientes de abatedouro e em 33.3% dos frangos resfriados do comércio (NALÉRIO et al., 2009). O homem adquire a infecção principalmente ao ingerir carne de frango mal cozida e seus produtos (SCHUCHAT; SWAMINATHAN; BROOME, 1991).

A listeriose representa um sério risco à vida humana (SWAMINATHAN; GERNER, 2007), sendo que a taxa média de letalidade pode ser de 20 a 30%, apesar do tratamento antimicrobiano adequado (GOULET et al., 1995). *L. monocytogenes* é responsável por várias síndromes no homem, entre as principais estão abortos, meningoencefalite, gastroenterite febril (com vômitos e diarreia) e bacteremia. Infecções focais, incluindo endocardite, artrite séptica, osteomielite e peritonite, são raras e geralmente precedidas por septicemia (NIEMAN; LORBER, 1980). A bactéria também pode causar conjuntivite e infecção cutânea eczematosa, principalmente em trabalhadores e veterinários que

manipulam galinhas infectadas e outras espécies animais (FELSENFELD, 1951; GODSHALL; SUH; LORBER, 2013).

A listeriose durante a gravidez ocorre mais frequentemente no terceiro trimestre. A infecção na mãe pode ser assintomática. No entanto, pode ter consequências graves para a criança, incluindo aborto espontâneo, morte fetal, natimorto, septicemia neonatal grave e meningite (ROCOURT; JACQUET; REILLY, 2000). Em adultos não gestantes, *L. monocytogenes* tem um particular tropismo pelo sistema nervoso central, e infecções do parênquima cerebral e meninges são, portanto, frequentes em casos de listeriose (ROCOURT; JACQUET; REILLY, 2000). As populações de risco incluem mulheres gestantes e recém-nascidos, adultos com doenças intercorrentes (pacientes com câncer, receptores de transplante de órgãos, pessoas com AIDS, doença hepática crônica, diabetes) e idosos (ROCOURT; JACQUET; BILLE, 1997).

Salmonelose aviária

O gênero *Salmonella* faz parte da família Enterobacteriaceae e é constituído de bacilos Gram negativos não formadores de esporos (BARROW, 2000). Atualmente, o gênero *Salmonella* é composto por duas espécies, *Salmonella enterica*, isolada mais comumente do homem e de animais de sangue quente e *Salmonella bongori*, isolada usualmente de animais de sangue frio (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

Em aves, os sorotipos de importância e que levam a sinais clínicos e lesões como onfalite, quadros diarreicos, dificuldade respiratória, massa de aspecto caseoso no globo ocular, artrite e sinovite, torcicolo, opistótono, incoordenação motora e paralisia são a *Salmonella Gallinarum* e a *S. Pullorum* (SANTOS; MOREIRA; DIAS, 2009). Outros sorotipos denominados paratíficos estão presentes nas aves sem causar necessariamente lesões e sintomatologia nesses animais. No entanto, segundo Corrier (1991), esse grupo denominado paratifoide que compreende, por exemplo, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg* apresenta grande importância como zoonose no âmbito da saúde pública. Quando as aves são infectadas por esse grupo de bactérias específicas, elas acabam transmitindo esse microrganismo para os alimentos como carne e ovos, e assim há o desenvolvimento da doença no ser humano com manifestação de diarreia, septicemia e febre, podendo chegar ao óbito. Portanto, a salmonelose é uma zoonose e gera toxinfecção alimentar em mamíferos (humanos), caso consumam alimentos infectados (MEAD, 2000).

Aves resistentes à doença tornam-se portadoras assintomáticas e crescem dentro dos parâmetros zootécnicos esperados, produzindo ovos contaminados e sendo, portanto, difícil a detecção de um portador assintomático, já que esses eliminam periodicamente o agente através das fezes (BEER, 1999; HIRSH, 1999). As aves, principalmente galinhas e perus, são as principais fontes de infecção de salmonela para o homem (BACK, 2010). A salmonela pode permanecer viável no material fecal por anos, particularmente em fezes secas, sendo ainda encontrada em efluentes de água e esgoto, resultado este de infecção humana por via feco-oral (BERCHIERI, 2000).

A transmissão horizontal ocorre de maneira fecal-oral e eliminação pelas fezes. Nas aves pode ocorrer também a transmissão vertical a partir do ovário infectado, dando origem ao nascimento de pintos contaminados (RODRIGUES, 2005a). Alimentos contaminados pela bactéria como, por exemplo, carnes ou ovos, podem desencadear surtos da salmonelose em humanos, levando aos principais sintomas que consistem em diarreia e febre. Alimentos feitos à base de ovos também são excelentes para garantir a sobrevivência e transmissão da *Salmonella sp.*, uma vez que possuem a sacarose, um importante composto para o seu metabolismo (QUEIROZ, 2002).

Considerando que a maioria dos quadros de gastroenterite transcorre sem a necessidade de hospitalizações e sem o isolamento do agente causal no alimento incriminado, a ocorrência das salmoneloses na população humana, transmitida por alimentos, é provavelmente subestimada, principalmente pela falta de notificações e confirmações da causa desses quadros clínicos (SHINOHARA et al., 2008).

Tuberculose aviária

A tuberculose aviária, causada pela bactéria *Mycobacterium avium*, é uma doença que afeta aves domésticas, selvagens nativas e exóticas (TELL; WOODS; CROMIE, 2001). O gênero *Mycobacterium* é um grupo de bactérias intracelulares facultativas que pertencem à família *Mycobacteriaceae*, possuem parede celular rica em lipídios e são resistentes à dessecação, luz ultravioleta e congelamento (COELHO et al., 2013; LOUREIRO et al., 2013).

O complexo *Mycobacterium avium* (MAC) compreende *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *silvaticum* e *M. intracellulare*, podendo infectar diferentes espécies de animais como suínos, bovinos, veados, ovelhas, cabras, cavalos, gatos, cães e espécies exóticas, além de causar infecção em seres humanos imunodeprimidos (DHAMA et al., 2011).

A micobacteriose é uma zoonose mundial relatada principalmente em aves da ordem Psitaciformes. Entre as espécies mais comuns estão *Amazona aestiva* (papagaio-verdadeiro) e *Amazona amazônica* (papagaio-do-mangue), ambos da fauna nativa brasileira e frequentemente mantidos como *pets*. A transmissão geralmente ocorre via fecal-oral e através da inalação de aerossóis (BAQUIÃO et al., 2014).

Nas aves, os sinais clínicos incluem fraqueza, perda de peso progressiva, anorexia, danos nas penas, distensão abdominal, diarreia, letargia e morte. Pode ocorrer também dispneia, cegueira e claudicação nos casos de infecção pulmonar, ocular ou envolvimento ósseo (CONVERSE, 2007). O local da lesão primária pode indicar a via de exposição, enquanto lesões intestinais sugerem ingestão de alimentos e água contaminados com a bactéria, lesões nos pulmões e outras áreas do trato respiratório indicam que a via de exposição ao agente infeccioso foi a aerógena. (FRIEND; FRANSON, 1999).

O diagnóstico *ante-mortem* é baseado nos sinais clínicos, leucograma, sorologia e cultura, e no *post-mortem*, necropsia e histologia. Técnicas de diagnóstico molecular como

a reação em cadeia pela polimerase (PCR) estão sendo desenvolvidas para detecção e diferenciação de diferentes espécies de micobactérias e utilizadas como ferramentas para o diagnóstico *ante-mortem* (BAQUIÃO et al., 2014; SOLER; BRIEVA; RIBÓN, 2009).

As micobactérias são altamente resistentes a antibióticos e o tratamento é ineficaz. A quimioprofilaxia não é recomendada devido ao risco de resistência das micobactérias com potencial zoonótico. É aconselhada a eutanásia dos animais afetados, além da adoção de medidas rigorosas de higiene (HOOP, 1997; FRIEND et al., 1999; SOLER; BRIEVA; RIBÓN, 2009). Informações sobre infecção por micobactérias em aves são limitadas e incompletas. O estudo da tuberculose aviária contribuirá para diminuir o papel das aves como vetores na transmissão de *M. avium* aos animais domésticos, assim como para os humanos (SOLER; BRIEVA; RIBÓN, 2009; LOUREIRO et al., 2013).

CONCLUSÃO

Doenças emergentes e reemergentes são a consequência da interação entre, principalmente, aves domésticas e silvestres e estas por sua vez, com o homem. Dentre essas doenças, as zoonoses bacterianas das aves domésticas e silvestres apresentam maior visibilidade, visto que esses animais podem representar o principal reservatório desses patógenos para o ser humano. Frente à maior interação entre o homem e a ave doméstica e/ou silvestre ressalta-se a importância do médico-veterinário atuando como principal disseminador de informações para a população humana, buscando, dessa forma, esclarecer questões vitais e conquistar uma relação saudável e harmoniosa entre o homem e as aves.

REFERÊNCIAS

- ALLOS, B. M. *Campylobacter jejuni* infections: Update on emergin gissuesand trends. *Clinical Infectious Disease*, v.32, n.8, p.1201-1206, 2001.
- ANDERSEN, A. A.; VANROMPAY, D. Avian Chlamydiae (psittacosis, ornithosis). In: SAYF, Y. M. *Disease of poultry*. 11.ed. Ames: Iowa State University, p.863-879, 2003.
- ATABAY, H. I.; WAINO, M.; MADSEN, M. Detection and diversity of various *Arcobacter* species in Danish poultry. *International Journal of Food Microbiology*, v.109, p.139-145, 2006.
- BACK, A. *Manual de doenças de aves*. 2.ed. Cascavel: Integração, 2010. p.311.
- BAQUIÃO, A. C.; LUNA J. O.; MEDINA, A. O.; SANFILIPPO, L. F.; FARIA, M. J.; SANTOS, M. A. A. Optimized Nested Polymerase Chain Reaction for antemortem detection of Mycobacteria in Amazon parrots (*Amazona aestiva*) and Orange-winged amazons (*Amazona amazônica*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.45, n.14, p.161-164, 2014.
- BARROW, P. A. The paratyphoid salmonellae. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, v.19, n.2, p.351-375, 2000.

- BEER, J. *Doença Infecciosa em Animais Domésticos: Salmonelose das Galinhas*. São Paulo: Roca, 1999. p.82.
- BERCHIERI, Jr. A.; Macari, M. Salmoneloses Aviárias. In: *FACTA. Doença das Aves*. Campinas. Cap.4, p.185, 2000.
- BLACK, R. E.; LEVINE, M. M.; CLEMENTS, M. L.; HUGHES, T. P.; BLASER, M. J. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *Journal Infectious Disease*, v.157, n.3, p.472-479, 1988.
- BLASER, M. J.; ENGBERG, J. Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infection. In: NACHAMKIN, I.; SZYMANSKI, C. M.; BLASER, M. J. (Ed.). *Campylobacter*, 3rd ed. ASM Press, Washington, DC, p.99-122, 2008.
- BUTZLER, J. P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clinical Microbiology and Infection*, v.10, p.868-876, 2004.
- CDC – *Compendium of measures to control Chlamydia psittaci infection among humans (psittacosis) and petbirds (avian chlamydiosis)*, n.49, p.3-17, 2000.
- COELHO, A. C.; PINTO, M. L.; MATOS A.; MATOS, M.; PIRES, M. A. *Mycobacterium avium* Complex in Domestic and Wild Animals. *Insights from Veterinary Medicine*, p.91-128, 2013.
- COLLADO, L.; FIGUERAS, M. J. Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.24, n.1, p.174-192, 2011.
- CONVERSE, C. A. Avian Tuberculosis. In: *Infectious Diseases of Wild Birds*, Editores: N. J. Thomas, D. B. Hunter, C. T. Atkinson. *Blackwell Publishing*, p.289-299, 2007.
- CORRIER, D. E. et al. Effect of anaerobic cecal microflora and dietary lactose on colonization resistance of layer chickens to invasive *Salmonella Enteritidis*. *Avian Diseases*, v.35, n.2, p.357-363, 1991.
- CRESPO, R.; GARNER, M. M.; HOPKINS, S. G.; SHAH, D. H. Outbreak of *Listeria monocytogenes* in an urban poultry flock. *BMC Veterinary Research*, v.9, n.204, p.1-5, 2013.
- CRUSHELL, E.; HARTY, S.; SHARIF, F.; BOURKE, B. Enteric *Campylobacter*: Purging its Secrets?. *Pediatric Research Journal*, v.55, n.1, p.3-12, 2004.
- CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. Clamidiose. *Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária*. São Paulo, p.760-766, 2006.
- DEBRUYNE, L.; GEVERS, D.; VANDAMME, P. Taxonomy of the family Campylobacteraceae. In: NACHAMKIN, I.; SZYMANSKI, C. M.; BLASER, M. J. (Eds.). *Campylobacter*, 3rd ed. ASM Press, Washington, DC, p.3-25, 2008.
- DHAMA, K.; MAHENDRAN, M.; TIWARI, R.; SINGH, S. D.; KUMAR, D.; SINGH, S.; SAWANT, P. M. Tuberculosis in Birds: Insights into the *Mycobacterium avium* Infections. *Veterinary Medicine International*, p.1-14, 2011.
- FELSENFELD, O. Diseases of poultry transmission to man. *Iowa State University Veterinarian*, v.13, n.2, p.89-92, 1951.
- FENGA, C.; CACCIOLA, A.; DI NOLA, C.; CALIMERIS, S.; LO, G. D.; PUGLIESE, M.; NIUTA, P. P.; MARTINO, L. B. Serologic investigation of the prevalence of *Chlamydophila psittaci* in occupationally exposed subjects in eastern Sicily. *Annals of Agriculture and Environmental Medicine*, v.14, p.93-96, 2007.

- FRIEND, M.; FRANSON, J. Mycobacteriosis. In: Field manual of wildlife diseases, general field procedures and diseases of Birds. *US Department of the Interior – US Geological Survey, Biological Resources Division, Information and Technology, Report 199-001*. Washington, DC; p.93-98, 1999.
- GODSHALL, C. E.; SUH, G.; LORBER, B. Cutaneous listeriosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.51, n.11, p.3591-3596, 2013.
- GOULET, V.; JACQUET, C.; VAILLANT, V.; REBIÈRE, I.; MOURET, E.; LORENTE, C.; MAILLOT, E.; STÄINER, F.; ROCOURT, J. Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. *Lancet*, v.345, n.8964, p.1581-1582, 1995.
- GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann – Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, Paris, v.161, p.26-29, 2010.
- HANNU, T.; MATTILA, L.; RAUTELIN, H.; PELKONEN, P.; LAHDENNE, P.; SIITONEN, A.; LEIRISALO-REPO, M. *Campylobacter*-trigger ed reactive arthritis: a population-based study. *Rheumatology (Oxford)*, v.41, p.312-318, 2002.
- HARKINEZHAD, T.; GEENS, T.; VANROMPAY, D. *Chlamydophila psittaci* infections in birds: A review with emphasis on zoonotic consequences. *Veterinary Microbiology*, v.135, p.68-77, 2009.
- HERMANS, D.; PASMANS, F.; MESSENS, W.; MARTEL, A.; VAN IMMERSEEL, F.; RASSCHAERT, G.; HEYNDRIKX, M.; VAN DEUN, K.; HAESEBROUCK, F. Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*. *Vector borne and zoonotic diseases*, v.2, p.89-98, 2012.
- HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. *Salmonella*. In: *Veterinary Microbiology e Immunology. Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro, cap.10, p.69-72, 1999.
- HO, H. T. K. LIPMAN, L. J. A.; GAASTRA, W. *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential food borne zoonotic agent! *Veterinary Microbiology*, v.115, p.1-13, 2006.
- HO, H. T. K. LIPMAN, L. J. A.; GAASTRA, W. The introduction of *Arcobacter* spp. in poultry slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology*, v.125, p.223-229, 2008.
- HOOP, R. K. Public Health Implications of Exotic Pet Mycobacteriosis. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, v.6, n.1, p.3-8, 1997.
- HOUF, K.; ON, S. L.; COENYE, T.; MAST, J.; VAN HOOFF, J.; VANDAMME, P. *Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.55, p.713-717, 2005.
- HSUEH, P. R.; TENG, L. J.; YANG, P. C.; WANG, S. K.; CHANG, S. C.; HO, S. W.; HSIEH, W. C.; LUH, K. T. Bacteremia caused by *Arcobacter cryaerophilus* 1B. *Journal Clinical Microbiology*, v.35, p.489-491, 1997.
- JANSSEN, R.; KROGFELT, K. A.; CAWTHRAW, S. A.; VAN PELT, W.; WAGENAAR, J. A.; OWEN, R. J. Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, v.21, n.3, p.505-518, 2008.
- JEMMI, T.; STEPHAN, R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, v.25, n.2, p.571-580, 2006.

- JIANG, Z. D.; DUPONT, H. L.; BROWN, E. L.; NANDY, R. K.; RAMAMURTHY, T.; SINHA, A.; GHOSH, S.; GUIN, S.; GURLEEN, K.; RODRIGUES, S.; CHEN, J. J.; MCKENZIE, R.; STEFFEN, R. Microbial etiology of travelers' diarrhea in Mexico, Guatemala and India importance of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Arcobacter* species. *Journal Clinical Microbiology*, v.48, n.4, p.1417-1419, 2010.
- KAACKOUSH, N. O.; CASTAÑO-R. N.; MITCHELL, H. M.; MAN, S. M. Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, v.28, n.3, p.687-720, 2015.
- KABEYA, H.; MARUYAMA, S.; MORITA, Y.; OHSUGA, T.; OZAWA, S.; KOBAYASHI, Y.; ABE, M.; KATSUBE, Y.; MIKAMI, T. Prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan. *International Journal of Food Microbiology*, v.90, n.3, p.303-308, 2004.
- LEHNER, A.; TASARA, T.; STEPHAN, R. Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential food borne pathogen. *International Journal Of Food Microbiology*, v.102, n.2, p.127-135, 2005.
- LONGBOTTOM, D.; COULTER, L. J. Animal Chlamydioses and zoonotic implications. *Journal of Comparative Pathology*, v.128, p.217-244, 2003.
- LOUREIRO, F. F.; VALENTE, J.; SARGO, R.; MATOS, M. M.; COELHO, A. C. Micobacterioses em animais selvagens. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.108, n.587-588, p.113-119, 2013.
- MANSFIELD, L. P.; FORSYTHE, S. J. *Arcobacter butzleri*, *A. skirrowii* and *A. cryaerophilus* – potential emerging human pathogens. *Reviews in Medical Microbiology*, v.11, p.161–170, 2000.
- MCORIST, S. Obligate intracellular bacteria and antibiotic resistance. *Trends Microbiology*, v.8, n.11, p.483-486, 2000.
- MEAD, G.C. Prospects for competitive exclusion treatment to control salmonellas and other foodborne pathogens in poultry. *Veterinary Journal*, v.159, n.2, p.111-123, 2000.
- NALÉRIO, É. S.; ARAÚJO, M. R.; MENDONÇA, K. S.; BASSANI, M. T.; SILVA, W. P. *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.29, n.3, p.626-630, 2009.
- NASPHV – NATIONAL ASSOCIATION OF STATE PUBLIC HEALTH VETERINARIANS. Compendium of measures to control *Chlamydophila psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis). 2010.
- NIEMAN, R. E.; LORBER, B. Listeriosis in adults: a changing pattern. Report of eight cases and review of the literature, 1968-1978. *Reviews of Infectious Diseases*, v.2, n.2, p.207-227, 1980.
- ON, S. L.; STACEY, A.; SMYTH, J. Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteraemia. *Journal Infection*, v.31, p.225-227, 1995.
- OTTH, L.; WILSON, M.; FERNÁNDEZ, H. Desiccation resistance in *Arcobacter butzleri*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.32, p.311-312, 2001.
- PETERSEN, L.; MADSEN, M. *Listeria* spp. in broiler flocks: recovery rates and species distribution in vestigated by conventional culture and the Eia Fossmethod. *International Journal of Food Microbiology*, v.58, n.1-2, p.113-116, 2000.

- PROENÇA, L. M.; FAGLIARI, J. J.; RASO, T. F. Infecção por *C. psittaci*: uma revisão com ênfase em psitacídeos. *Cienc. Rural*, v.41, p.841-847, 2011.
- QUEIROZ, N. G. Salmonelose em Aves. Curso Básico de Sanidade Avícola 2002: Laboratório Fort Dodge, 9., Jaguariúma SP, v.2, 2002.
- RASO, T. F. Clamidiose. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO, D. J. L. *Tratado de animais selvagens*. São Paulo: Roca, cap.47, p.760-767, 2007.
- RASO, T. F.; GODOY, MILANENO, L.; SOUZA, C. A. I.; MATUSCHIMA, A. R.; JUNIOR, I. P. A.; PINTO, A. A. et al. An outbreak of chlamydiosis in captive blue fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) in Brazil. *Journal of Zoo and Wild life Medicine*, v.35, p.94-96, 2004.
- REITER, M. G. R.; BUENO, C. M.; LÓPEZ, C.; JORDANO, R. Occurrence of *Campylobacter* and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing plant. *Journal of Food Protection*, v.68, n.9, p.1903-1906, 2005.
- REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. Clamidiose aviária. *Patologia Aviária*. Barueri: Manole, p.367-373, 2009.
- ROBINSON, D. A. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *British Medical Journal (Clinical research ed.)*, v.282, n.6276, p.1584, 1981.
- ROCOURT, J.; JACQUET, C. H.; BILLE, J. Human listeriosis, 1991-1992. WHO/FNU/FOS/97.1. *World Health Organization*, Geneva, 1997.
- ROCOURT, J.; JACQUET, C. H.; J.; REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and sea foods. *International Journal of Food Microbiology*, v.62, n.3, p.197-209, 2000.
- RODRIGUES, D. P. Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícola. Ecologia e Prevalência de *Salmonella* spp. em aves e material avícola no Brasil. *Anais*, v.2, p.223-228. FACTA, São Paulo, 2005a.
- SANTOS, B. M.; MOREIRA, M. A. S.; DIAS, C. C. A. Doenças de etiologia bacteriana. In: *Manual de Doenças Avícolas*. ed.UFV, cap.3, p.107-116, 2009.
- SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C. V. Epidemiology of human listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v.4, n.2, p.169-183, 1991.
- SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. I.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciência Saúde Coletiva*, v.13, n.5, 2008.
- SILVA, J.; LEITE, D.; FERNANDES, M.; MENA, C.; GIBBS, P.A.; TEIXEIRA, P. *Campylobacter* spp. as a food borne pathogen: a review. *Frontiers in Microbiology*, v.2, n.200, p.1-12, 2011.
- SKARP, C. P.; HÄNNINEN, M. L.; RAUTELIN, H. I. Campylobacteriosis: The role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, v.22, n.2, p.103-109, 2016.
- SNELLING, W. J.; MATSUDA, M.; MOORE, J. E.; DOOLEY, J. S. Under the microscope: *Arcobacter*. *Letters in Applied Microbiology*, v.42, n.1, p.7-14, 2006.
- SOLER, D.; BRIEVA C.; RIBÓN W. Mycobacteriosis in wild birds: the potential risk of disseminating a little-known infectious disease. *Rev. Salud Pública*, v.11, n.1, p.134-144, 2009.
- SWAMINATHAN, R.; GERNER-S. P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, v.9, n.10, p.1236-1243, 2007.

- TELFER, B. L.; MOBERLEY, S. A.; HORT, K. P.; BRANLEY, J. M.; DWYER, D. E.; MUSCATELLO, D. J.; CORRELL, P. K.; ENGLAND, J.; MCANULTY, J. M. Probable psittacosis outbreak linked to wild birds. *Emerging Infectious Diseases*, v.1, n.3, p.391-397, 2005. Disponível em: <http://journal.shouxi.net/qikan/article.php?id=223293>. Acesso em: 26 mar. 2016.
- TELL, L. A.; WOODS, L.; CROMIE, R. L. Mycobacteriosis in birds. *Rev. Sci. Tech. Office International Epizooties*, v.20, n.1, p.180-203, 2001.
- VANDAMME, P.; PUGINA, P.; BENZI, G.; VAN ETTERIJCK, R.; VLAES, L.; KERSTERS, K.; BUTZLER, J. P.; LIOR, H.; LAUWERS, S. Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. *Journal of Clinical Microbiology*, v.30, n.9, p.2335-2337, 1992.
- VANDENBERG, O.; DEDISTE, A.; HOUF, K.; IBEKWEM, S.; SOUAYAH, H.; CADRANEL, S.; DOUAT, N.; ZISSIS, G.; BUTZLER, J. P.; VANDAMME, P. *Arcobacter* species in humans. *Emerging Infectious Disease*, v.10, n.10, p.1863-1867, 2004.
- VUCIC, S.; KIERNAN, M. C.; CORNBLATH, D. R. Guillain-Barrésyndrome: na up date. *Journal of Clinical Neuroscience*, v.16, p.733-741, 2009.
- WEST, A. A. Brief review of *Chlamydophila psittaci* in birds and humans. *Journal Exotic Pet Medicine*, v.20, p.18-20, 2011.
- WHITEDUCK, L. K.; WHITEDUCK, L. J.; CLOUTIER, M.; TAMBONG, J. T.; XU, R.; TOPP, E.; ARTS, M. T.; CHAO J.; ADAM, Z.; LÉVESQUE, C. A.; LAPEN, D. R.; VILLEMUR, R.; KHAN, I. U. Identification, characterization and description of *Arcobacter faecis* sp. nov., isolated from a human waste septic tank. *Systematic and Applied Microbiology*, v.39, n.2, p.93-99, 2015.

ANEXO 4



Brazilian Journal of Poultry Science
Revista Brasileira de Ciência Avícola

ISSN 1516-635X Oct - Dec 2019 / v.21 / n.4 / 001-006

<http://dx.doi.org/10.1590/1806-9061-2019-1072>

Original Article

An Outbreak of Intestinal Obstruction by *Ascaridia Gallii* in Broilers in Minas Gerais

Author(s)

- Torres ACD¹  <https://orcid.org/0000-0002-7199-6917>
 Costa CS²  <https://orcid.org/0000-0003-0701-1733>
 Pires PN³  <https://orcid.org/0000-0001-7577-1879>
 Santos HA¹  <https://orcid.org/0000-0002-0565-3591>
 Amante AF⁴  <https://orcid.org/0000-0003-2496-2282>
 Gómez SYM⁵  <https://orcid.org/0000-0002-9374-5931>
 Resende M¹
 Martins NRS¹  <https://orcid.org/0000-0001-8925-2228>

¹ Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Veterinária - Medicina Veterinária Preventiva - Campus Pampulha da URMG - Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

² Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

³ Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", campus de Botucatu.

Mail Address

Corresponding author e-mail address
 Nelson Rodrigo da Silva Martins
 Universidade Federal de Minas Gerais -
 Medicina Veterinária Preventiva - Avenida
 Antônio Carlos, 6627 Campus da
 Pampulha Belo Horizonte Minas Gerais,
 Brazil, 31270-901.
 Phone: (55 31) 3409-2093
 Email: nelfosmart@gmail.com

Keywords

Ascariose, broiler chicken, nematode, enteritis.



Submitted: 13/April/2019
 Approved: 29/October/2019

ABSTRACT

Industrial broilers raised on helminthic medication-free feed were diagnosed with a severe disease caused by *Ascaridia galli*, characterized by intestinal hemorrhage and obstruction. *A. galli* was identified based on the morphological features of the nematode. Broilers were raised for a longer period (63 days) for weight recovery, grouped as stunted (n=500), had low body score and had fetid diarrhea. The duodenum-jejenum segment was the most severely affected with obstruction and had localized accumulation of gas. The intestinal mucosa was severely congested with petechial and suffusive hemorrhages. The outbreak resulted in morbidity of about 10% and mortality of up to 4% and was associated to the absence of preventive medication on feed and slack biosecurity. The reemergence of *A. galli* is discussed in view of the alternative poultry management and raising conditions for drug free and welfare.

INTRODUCTION

Ascaridia galli is returning to the relevant poultry diseases scene as alternative free-range broilers and cage-free layer chickens are progressively in higher demand by consumers. Floor and ground conditions enable the direct ingestion of eggs or larvae or mechanical vectors of *Ascaridia galli*, such as earthworms, which may concentrate and protect eggs (Augustine, 1974), although the transmission is mainly direct and the life cycle simple. Eggs develop infective larvae within about 12 days and are resistant to cold. The normal development and viability of *A. galli* eggs is highest in anaerobic conditions in feces at cold temperatures but lowest in feces or water at warmer temperatures, as eggs maintained in normal embryogenesis with little loss of viability in feces at 4°C, but with large viability losses in clean water at 25°C (Tarbiat *et al.*, 2018). Infection will result in reduced productive performance of meat or eggs, and high parasitic load will cause intestinal blood loss, increased mortality, and anemia, and may aggravate other conditions (Norton & Ruff, 2003).

In Germany, cage-free organic layers were shown to harbor, mostly subclinically, the nematodes *Ascaridia galli* (88%), *Heterakis gallinarum* (98%), and *Capillaria* spp (75.3%) (Kaufmann *et al.*, 2011). In Sweden, layers are challenged with genetically related *Ascaridia galli* strains, indicating recent and stationary flock infections (Höglund *et al.*, 2012). A more extensive study in eight European countries investigated helminthic infection, revealing *A. galli* with an overall prevalence of 69.5%, and that, in contrast to the general assumption, the outdoor pasture did not correlate to the infection (Thapa *et al.*, 2015).

In Brazil (São Paulo), adult chickens of different housing and management strategies, were shown most commonly infected by *A.*



galli and *Heterakis gallinarum* (Silva et al., 2016). An outbreak of intestinal disease in *Pavo cristatus* causing diarrhea, dehydration, anorexia and weight loss, was associated to *A. galli* (Teixeira et al., 2012). Wild native and exotic domestic avian species were investigated for the presence of endoparasites in feces and found *A. galli* in *Buteo magnirostris* and *P. cristatus* (Marietto-Gonçalves et al., 2009; Andery et al., 2013).

This manuscript aims to report an outbreak of severe infection by *Ascaridia galli* resulting in intestinal hemorrhage and obstruction and high mortality of industrial broilers raised on medication-free feed.

MATERIALS AND METHODS

Broilers (n=4) which were raised up to nine weeks of age were received for diagnosis, with history of morbidity of approximately 10% and mortality of approximately 4%. The flock was formed by gathering stunted chicks for separate management and characterized by low performance, stunted growth and low body weight. All birds in the sample were chosen considering the stunted growth. Broilers were raised on balanced nutrient but helminthic medication-free diet, with a total of 500 birds in the flock. Housing was in conventional brick house for industrial broilers, with industrial grade feeders and drinkers, forced ventilation, curtains, cemented floor and wood shavings bedding. However, biosecurity was not effective, without entrance control, allowing visitation, with no footbath or vehicle disinfection. Complete necropsies were performed, and nematodes collected, processed, mounted as described previously (Bowman, 2009), and identified according to the morphology and micrometry (Soulsby, 1982). Briefly, nematodes were immersed in warm buffered saline (PBS pH 7.4) and within a few minutes were subsequently transferred to a buffered formaline solution (formaldehyde 10% in PBS). Helminths were diaphanized in lactophenol (20% phenic acid, 20% lactic acid, 40% glycerine; 20% distilled water) and mounted onto glass slides with coverslip in melt phenolgelatin (10g gelatin; 60mL distilled water; 70ml glycerine; 0.5mL phenic acid) and visualized with an optical microscopy (Olympus B-H2) at 40 and 100 magnifications.

RESULTS AND DISCUSSION

Broilers were described with chronic fluid fetid diarrhea and showed low body score for the age, with prominent carina (sternum), as a result of reduced pectoral mass. Enlarged intestines with gas

accumulations were seen at necropsy, where *Ascaridia galli* concentrated, mostly at the cranial part of the jejunum, causing obstruction and mucosal congestion (Fig. 1). The microscopic aspects of the morphology of *A. galli* adults and eggs are shown (Fig. 2).

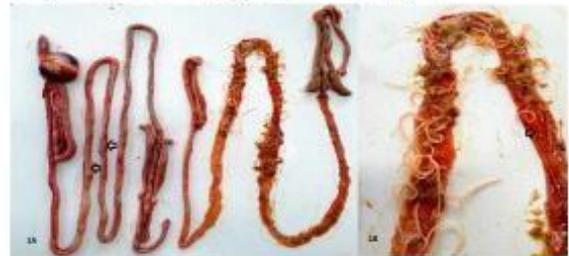


Figure 1 – A: Small intestines of broiler chicken. Intestinal segments are enlarged and with accumulations of gas (arrows), as a result of obstructions by *Ascaridia galli*, especially at the cranial part of jejunum. B: High burden of *Ascaridia galli* with congested mucosa (arrow) in the jejunum.

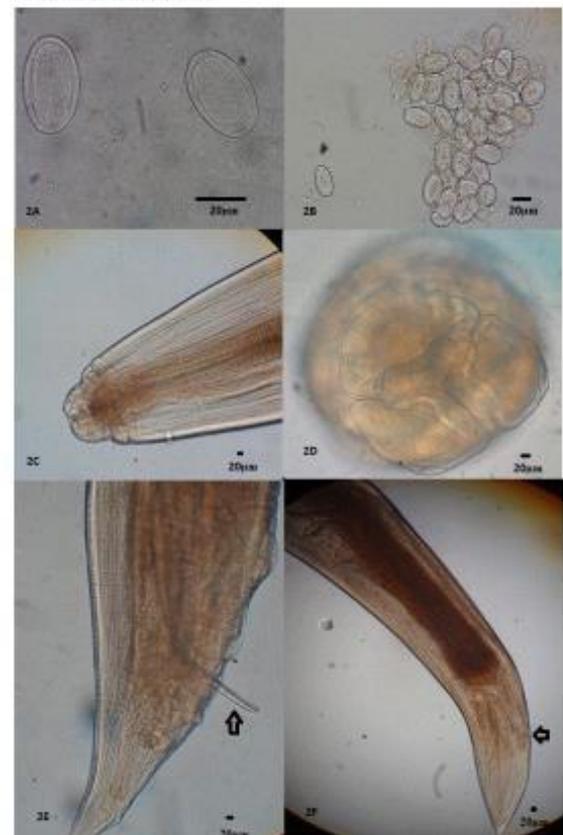


Figure 2 – *Ascaridia galli* 2A and 2B: Eggs; Note that eggs are characterized by a thick shell; 2C: Lateral view of the buccal apparatus of male; 2D: Frontal view of the buccal entrance of a male, showing three-independent lips. 2E: Ventral view of the male reproductive organs; the spicule is visible (arrow); 2F: Lateral view of the female caudal end, with the anus visible (arrow).



Ascaridia infections are known to be rare in caged chickens, including welfare cages, but common in non-caged systems, as here described for indoor broilers. In the outbreak here described, broilers were raised in conventional houses, but without adequate biosecurity, such as entrance control for visitors or vehicle disinfection, and were given feed with no anthelmintic medication. The improvement of management factors such as housing, litter and nutritional quality, schedule times of opening and closing popholes, alternation of pasture and supply of required materials may have a role in the reduction of the helminthic load (Thapa *et al.*, 2015), as free-range conditions enable the ingestion of eggs or larvae, or mechanical vectors of *Ascaridia galli*, such as earthworms (Augustine, 1974). Although free-range on grass did not correlate to *Ascaridia galli* infection in Europe (Thapa *et al.*, 2015), despite temperatures of 18.8°C or lower will stop larva development (Reid, 1960), but preserving its viability (Tharbiat *et al.*, 2018), the climatic and environmental conditions may have a role in other regions, such as cooler climates. *A. galli* has a broad avian host range and infection has been described in industrial and free-range chickens, and wild species (Marietto-Gonçalves *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2016; Teixeira *et al.*, 2012; Andery *et al.*, 2013).

Lesions by *A. galli* will harm intestinal function and performance, with retarded growth and production (Daş *et al.*, 2012), especially by larval stages (Luna-Olivares *et al.*, 2015), as here observed as intestinal hemorrhages and obstruction.

The introduction of *Ascaridia galli* infection in the premises might be associated to infected replacement chickens (Höglund *et al.*, 2011), although the established infection will maintain a local genetic profile identity, and with genetic variations among farms (Höglund *et al.*, 2012). Broilers in the present outbreak were raised in premises without entrance control, hence insufficient biosecurity. Visitor entry to the house or unit is a management error which results in eggs introduced horizontally into the farms (Jansson *et al.*, 2010).

Ascariidiosis seems to be reemerging in several countries due to alternative raising or housing. In Serbia, hens of organic egg production were found 15.6-24.0% positive for *A. galli* (Tamara *et al.*, 2019). In Argentina, broiler chicken flocks were evaluated and 25% of flocks were shown infected but no correlation was found between nematodes and coccidial infections (De Franceschi *et al.*, 2008). Previous studies in Brazil, have found broiler flocks infected by *Ascaridia*

galli in 10/17 municipalities of São Paulo (Da Silva *et al.*, 2018), in free-range flocks in the neighboring state (Paraná), with 45% infected (Vieira *et al.*, 2015), and in Santa Catarina in 21.7% (Quadros *et al.*, 2015). In our study, we show that raising broilers in Minas Gerais, previously shown to naturally occur *A. galli* by Mendes *et al.* (1976) and in our unpublished extension service, especially for longer and without preventive medication, may lead to highly significant infection.

The information available on the affected flock revealed the strategic use of mebendazole for treatment against ascariidiosis. However, more effective drugs have been recommended against *A. galli*, such as fenbendazole, dl-tetramizole, levamisole or pyrantel tartrate (Norton & Ruff, 2003), none of which are permitted in drug-free poultry.

The climatic conditions and change in Brazil may favor parasitism in most of the Brazilian territory, with the survival of eggs in feces, especially at cooler temperatures (Tharbiat *et al.*, 2018). The adoption of medication-free diet will demand for frequent fecal monitoring and strict biosecurity, in order to reduce the risk of helminthiasis. However, the use of anthelmintics has been considered a selective pressure for resistance. For instance, the subtherapeutic preventive dosage with benzimidazole has been involved in resistance by *Ostertagia ostertagi* in bovines (Knapp-Lawitzke *et al.*, 2015).

CONCLUSIONS

The parasitism by *Ascaridia galli* in broilers is a growing concern worldwide, especially for alternative poultry, or in drug-free raising of broilers, as shown here. The growth of industrial broilers in medication-free diets will demand for all the adequate preventive veterinary medicine measures to be taken.

REFERENCES

- Andery DA, Ferreira Junior FC, Araújo AV, Vilela DAR, Marques MVR, Marin SY, *et al.* Health assessment of raptors in triage in Belo Horizonte, MG, Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science* 2013;15(3):247-256.
- Bowman DD. *Georgis' parasitology for veterinarians*. 9th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009.
- Daş G, Abel H, Rautenschlein S, Humburg J, Schwarz A, Breves G, *et al.* The effects of dietary non-starch polysaccharides on *Ascaridia galli* infection in grower layers. *Parasitology* 2012;139:110-119.
- Silva GS, Romera DM, Silva Conhalato G, Soares VE, Meireles MV. Helminth infections in chickens (*Gallus domesticus*) raised in different production systems in Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 2018;12:55-60.

