

ANA CAROLINE DOYLE TORRES

**Detecção e caracterização molecular do Vírus da**

**Doença de Marek em Minas Gerais**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia

Orientador: Prof. Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária da UFMG  
2017

T693d Torres, Ana Caroline Doyle, 1989-  
Detecção e caracterização molecular do vírus da doença de Marek em Minas Gerais / Ana Caroline Doyle Torres. – 2017.  
72 p. : il.

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

I. Galinha – Doenças – Teses. 2. Ave doméstica – Doenças – Teses. 3. Marek, Doença de – Teses. 4. Virologia veterinária – Teses. I. Martins, Nelson Rodrigo da Silva. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.508 969 2



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**ANA CAROLINE DOYLE TORRES**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA.

Aprovada em 10 de Fevereiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins  
Presidente - Orientador

Prof. José Sérgio de Resende  
Escola de Veterinária - UFMG

Prof.ª Erica Azevedo Costa  
Escola de Veterinária - UFMG

Prof.ª Sandra Yuliet Marín Gomez  
Escola de Veterinária - UFMG



À Minha família que mesmo estando longe fisicamente, se faz presente no meu dia-a-dia. Principalmente a minha mãezinha por simplesmente ser a pessoa que toda filha teria o privilégio de chamar de mãe. Ao amor da minha vida, Dionei. À equipe do laboratório de doenças das aves da UFMG. À eles dedico este trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à minha família, principalmente à minha mãe, Vera e minha amada vizinha, Nelcy, pelo apoio incondicional durante todo este período que estou longe de casa.

Agradeço a minha irmã, Carla pelo amor e carinho! Te amo, mana.

Agradeço ao meu pai, Jorge pelo carinho e amor!! Te amo, pai!!

Um agradecimento especial para o amor da minha vida, Dionei. Amor, muito obrigada por estar sempre ao meu lado, não importando os percalços do caminho. Obrigada por ser essa pessoa que eu tanto amo. Te amo do tamanho do céu!!!

Agradeço imensamente à Natália, pela amizade, carinho, companheirismo durante todo esse período em que esteve sempre ao meu lado me ajudando em tudo o que fosse preciso. Muito obrigada por tua amizade!!! Agradeço-te imensamente.

Ao meu orientador Prof. Nelson pela amizade, carinho, orientação, pelos cafezinhos sempre regados com uma boa conversa. Muito obrigada pela forma a qual me acolheu em seu laboratório. Nunca esquecerei do seu carinho.

À Sandrinha pela atenção, carinho e amizade, boas risadas desde o momento em que cheguei ao laboratório. Muito obrigada por tudo, principalmente por tua co-orientação. Esse trabalho também é teu.

Aos professores José Sergio Resende e Maurício Resende pela amizade, carinho e atenção.

Aos colegas Aila, Rui, Talita e Carolina pela amizade e carinho!

Agradeço imensamente a toda equipe do Laboratório de Doenças das Aves pela ajuda durante todo esse período de minha vida!! Muito obrigada!

À equipe do Laboratório de Genética da Escola de Veterinária. Obrigada pela atenção de vocês.

A equipe de limpeza da Escola de Veterinária que propiciou um ambiente favorável para que pudéssemos desenvolver nossas pesquisas.

Aos animais utilizados os quais viabilizaram a realização dessa pesquisa científica.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao CNPq, FAPEMIG pelo recurso financeiro para a realização da pesquisa científica.

Muito obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Madre Teresa de Calcutá

## RESUMO

O vírus da doença de Marek (MDV) é um agente infeccioso que atinge, principalmente, galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*), tanto da avicultura industrial quanto de subsistência, causando uma doença inflamatória linfo-proliferativa conhecida como doença de Marek (DM). A doença acarreta em grandes perdas produtivas e econômicas à avicultura tecnificada, com impacto também à avicultura de subsistência. A ocorrência de MD foi reduzida dramaticamente com o uso da vacinação obrigatória dos pintinhos no incubatório desde os anos 1970. A emergência de estirpes de alta e muito alta virulência do vírus de MD (MDV), entretanto, foi relatada em vários países, envolvidas em surtos em plantéis vacinados. No entanto, apesar do Brasil ser o maior exportador mundial de carne de frango, não se conhece o perfil genético molecular de MDV. Descreve-se a caracterização molecular de estirpes de MDV baseada no sequenciamento de parte do gene que codifica a proteína Meq de MDV, em galinhas da avicultura de subsistência e industrial de Belo Horizonte e região metropolitana. Aves com quadro clínico sugestivo de DM foram admitidas no Laboratório de Doenças das Aves e examinadas. De um total de 112 aves positivas para MDV, quinze (13,4%) isolados com potencial patogênico foram detectados, dois sendo caracterizados como MDV de alta virulência (vvMDV), e os demais treze isolados caracterizaram-se como MDV virulentos (vMDV) clássicos. A presença de estirpes de vvMDV pode representar aumento do risco de falha da proteção vacinal nos plantéis industriais. Entretanto, na grande maioria das aves (86,6%) não foi detectado MDV patogênico. De um total de cento e doze galinhas positivas para MDV, setenta e cinco aves apresentaram um quadro de infecção simultânea entre MDV e um ou mais agentes infecciosos. O cenário de infecções simultâneas ou coinfeções entre MDV e outros agentes endêmicos sugere ser representativo da condição comum na epidemiologia das infecções em aves. A caracterização molecular de MDV e a co-infecção por alguns importantes agentes infecciosos é discutida.

Palavras-Chave: Avicultura, virulência, Meq, infecção simultânea, agentes infecciosos.

## ABSTRACT

Marek disease virus (MDV) is an infectious agent that affects primarily domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*), both of industrial poultry farming as of subsistence, causing a lymphocytic inflammatory disease-known as proliferative Marek disease (MD). The disease causes in productive and economic losses to poultry, but also impact the poultry. The occurrence of MD was reduced dramatically with the use of mandatory vaccination of hatchery chicks since the years 1970. The emergence of strains of high and very high virulence of MD virus (MDV), however, was reported in several countries, involved in outbreaks in vaccinated flocks. However, in spite of Brazil being the world's largest exporter of chicken meat, no known molecular genetic profile of MDV. Describes the molecular characterization of MDV strains based on sequencing of the gene encoding the protein Meq of MDV, in chickens of subsistence and industrial poultry farming of Belo Horizonte and metropolitan region. Birds with clinical picture suggestive of DM were admitted in the laboratory of poultry Diseases and examined. A total of 112 birds positive for MDV, fifteen (13.4%) isolates with pathogenic potential were detected, two being characterized as high virulence MDV (vvMDV), and the remaining thirteen isolates were characterised as MDV virulent (vMDV) classics. The presence of vvMDV strains may represent increased risk of failure of vaccine protection in industrial stocks. However, in the vast majority of birds (86.6%) was not detected MDV pathogen. A total of 112 chickens positive for MDV, 75 birds presented a painting of simultaneous infection between MDV and one or more infectious agents. The scenario of concurrent infections or coinfeções between MDV and other endemic agents suggests be representative of common condition on epidemiology of infections in birds. Molecular characterization of MDV and co-infection by some important infectious agents is discussed

Keywords: Poultry, virulence, Meq, concurrent infection, infectious agents.

---

## SUMÁRIO

---

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....;	12-13
OBJETIVOS.....	13
CAPÍTULO I- REVISÃO DE LITERATURA	
1. Histórico.....	13-14
2. A doença.....	14
3. Características gerais do vírus da doença de Marek.....	15
4. Patogenia.....	15-16
5. Epidemiologia.....	16-17
6. A doença no Brasil.....	17-18
7. Ocorrência do vírus da doença de Marek em outras partes do mundo.....	19-21
8. Incubação.....	21-22
9. Diagnóstico.....	22
10. Controle e prevenção.....	22-25
CAPÍTULO II- CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DO VÍRUS DA DOENÇA DE MAREK	
Resumo.....	26
Introdução.....	26
1. Características moleculares.....	27-29
2. O aumento da virulência.....	29-32
CAPÍTULO III- INTERAÇÃO DO VÍRUS DA DOENÇA DE MAREK COM OUTROS AGENTES IMUNODEPRESSORES	
Resumo.....	33
Introdução.....	33
1. Vírus da doença de Marek e Vírus da anemia infecciosa das galinhas.....	33-34
2. Vírus da doença de Marek e <i>Mycoplasma gallisepticum</i> .....	35-36
3. Vírus da doença de Marek e <i>Avibacterium paragallinarum</i> .....	36-39
4. Vírus da doença de Marek e <i>Chlamydia psittaci</i> .....	39-40
CAPÍTULO IV- MATERIAL E MÉTODOS	
1. Laboratório.....	41



2. Comitê de ética.....	41
3. Amostras clínicas.....	41
4. Extração do DNA.....	41-42
5. Oligonucleotídeos iniciadores.....	42-43
6. Condições da reação em cadeia pela polimerase para detecção do vírus da doença de Marek, Vírus da anemia infecciosa das galinhas, <i>Mycoplasma gallisepticum</i> , <i>Chlamydia psittaci</i> e <i>Avibacterium paragallinarum</i> .....	43-44
7.1- Vírus da doença de Marek.....	43
7.2- Vírus da anemia infecciosa das galinhas.....	43
7.3- <i>Mycoplasma gallisepticum</i> .....	44
7.4- <i>Chlamydia psittaci</i> .....	44
7.5- <i>Avibacterium paragallinarum</i> .....	44
7. Análise dos produtos amplificados.....	44
8. Sequenciamento genético das sequencias de MDV.....	44-45
9. Análise das sequencias nucleotídicas de MDV.....	45
10. Busca de sequencias similares ao MDV.....	45
Resultados e discussão.....	46-62
Referências bibliográficas.....	63-71
Conclusões.....	72

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1- Principais genes envolvidos na oncogenicidade do MDV.....	28
Tabela 2- Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesse estudo.....	43
Tabela 3- Condições da reação em cadeia pela polimerase para detecção do Vírus da Doença de Marek, Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas, <i>Mycoplasma gallisepticum</i> , <i>Chlamydia psittaci</i> e <i>Avibacterium paragallinarum</i> .....	43-44
Tabela 4- Isolados referência de MDV publicadas no GenBank e utilizados como parâmetro molecular no estudo do oncogene <i>Meq</i> do vírus da doença de Marek.....	55
Tabela 3- Principais pontos de mutação do oncogene <i>Meq</i> , seguidos pelos isolados utilizados neste estudo e as respectivas mutações que ocorreram em cada um deles.....	59-60

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1- Aumento da virulência de MDV desde a descrição da doença de Marek.....	30
Figura 2- Relação entre o total de aves amostradas, estratificadas por sistema de produção, e aves positivas de cada grupo para a doença de Marek.....	47
Figura 3- Total de aves positivas para a presença do vírus da doença de Marek, estratificadas conforme o sistema de produção avícola.....	48
Figura 4- Relação dos agentes infecciosos em coinfeção com o vírus da doença de Marek em galinhas utilizadas no estudo, sendo MG( <i>Mycoplasma gallisepticum</i> ), AP ( <i>Avibacterium paragallinarum</i> ), CP ( <i>Chlamidophylla psittaci</i> ), CAV (Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas).....	49
Figura 5- Árvore filogenética construída pelo método <i>neighbor-joining</i> , para sequência do gene <i>Meq</i> de MDV (576 nt) a partir das sequências de nucleotídeos obtidas neste estudo e algumas sequencias depositadas no GenBank.....	56
Figura 6- Árvore filogenética construída pelo método <i>neighbor-joining</i> , para sequência do gene <i>Meq</i> de MDV (576 nt) a partir das sequências de nucleotídeos depositadas no GenBank.....	58

---

## LISTA DE ANEXOS

---

Anexo A- Aceite da Comissão de ética no uso de animais.....	73
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MDV- Vírus da Doença de Marek  
MD- Doença de Marek  
DNA –Ácido Desoxirribonucléico  
dNTP –Mistura de Desoxirribonucleotídeos trifosfatados  
(A: adenina, C: citosina, G: guanina e T: timina)  
EDTA – Ácido Etilenodiamino tetra- acético  
EUA –Estados Unidos da América  
g – Gramas  
h –Horas  
H<sub>2</sub>O –Água  
M – Molar  
mA –Miliampères  
Mb – Milhões de Bases  
mg –Miligramas  
MG –*Mycoplasma gallisepticum*  
AP- *Avibacterium paragallinarum*  
CAV- Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas  
CP- *Chlamidia psittaci*  
min – Minuto  
ml –Mililitro  
NaI –Iodeto de sódio  
OIE – Organização Mundial de Saúde Animal  
pb – Pares de bases  
PCR –Reação em Cadeia da Polimerase  
pH –Potencial Hidrogeniônico  
RNA –Ácido Ribonucléico  
rpm –Rotação por Minuto  
s –Segundos  
*Taq* –*Thermus aquaticus*  
TBE –Tris Borato (EDTA)  
TE –Tris - EDTA  
UFMG –Universidade Federal de Minas Gerais  
V –Volts  
°C –Graus Celsius  
µg –Micrograma  
µl –Microlitro

## INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

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 (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 (SCHAT; 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; SCHAT, 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.

## OBJETIVO

Este estudo teve por objetivo caracterizar molecularmente as estirpes do vírus da doença de Marek circulantes em Belo Horizonte e região metropolitana, assim como detectar agentes infecciosos em co-infecção com o vírus da doença de Marek.

## CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Histórico

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). No entanto, a doença adquiriu maior importância 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. No entanto, 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 muita pesquisa, sendo que a doença já foi relatada na maioria dos países, visto sua importância econômica e científica.

## **2. A doença**

A doença de Marek (MD) é causada por estirpes de MDV do sorotipo 1 caracterizada por ser 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).

### **3. Características gerais do Vírus da Doença de Marek**

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 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) em 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).

### **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 o MDV é um vírus estritamente associado a células, sendo que partículas virais livres somente são produzidas pela replicação nos 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).

## **5. Epidemiologia**

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, incluindo *Aburria kujubi*, *Aburria jacutinga*, *Crax alector*, *Crax blumembachii*, *Crax fasciolata*, *Pauxi tuberosum*, *Nothocrax urumutum*, *Pavo cristatus*, *Penelope obscura*, *Penelope superciliaris*, *Penelope ochrogaster*, *Lophura nycthemera* foi positiva para Meq (BLUME et al., 2016).

MDV replica-se nas células epiteliais da camada de queratina do folículo da pena e, desta forma as descamações epiteliais apresentam-se como uma fonte de contaminação para o meio ambiente (PAYNE; VENUGOPAL, 2000).

A transmissão do MDV ocorre através do contato direto ou indireto entre as aves, ocorrendo por via aérea (CALNEK; WITTER, 1997). O folículo da pena é o local primário de replicação viral 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).

Apesar do 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 sobreviver 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).

## 5. A doença 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 doença por *Gallid Herpesvirus 2* foi descrita 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 (BLUME et al., 2016).

Abreu et al.(2016) descreveu 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.

Há carência de informações referentes à caracterização de MDV no Brasil, principalmente sobre a ocorrência de estirpes de alta patogenicidade do MDV, tanto em populações pertencentes a avicultura industrial quanto de subsistência. A informação sobre as estirpes de MDV nas aves da avicultura de subsistência seria essencial para o Programa Nacional de Sanidade Avícola, para o melhor planejamento sanitário dos plantéis intensificados, especialmente com o surgimento da avicultura comercial alternativa e orgânica.

## **7. Ocorrência do Vírus da Doença de Marek em outras partes do 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.

Wozniczowski; Samorek-Salamonowicz; Kozdrun (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; Abdallah; El-Araby (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 sequências 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 do 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 rebanhos 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 recente estudo das características patogênicas de estirpes do MDV prevalentes na China. Segundo o autor, em rebanhos 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 protectores de 85,7%, 92,3% e 66%, respectivamente. Estes resultados demonstram que os isolados chineses apresentam variabilidade frente a virulência do MDV 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 patótipos 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.

## **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., 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).

## **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 (ABDUL-CAREEM 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).

## **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 não oncogênicas, possibilitando o 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 consequentemente o surgimento de amostras 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 os incubatórios de reprodução a aplicação da vacina contra a doença de Marek antes da expedição de aves de um dia. Com isso 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 é necessário 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 a 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 rebanhos 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 II – CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DO VÍRUS DA DOENÇA DE MAREK**

### **Resumo**

MDV apresenta grande importância tanto na avicultura intensiva, quanto na avicultura de subsistência. É essencial a caracterização de estirpes para que estratégias de prevenção e controle da doença possam ser traçadas. Nas últimas décadas, a MD tem sido controlada na avicultura intensiva através da vacinação, no Brasil obrigatória e precoce para todas as novas gerações. No entanto, o vírus de campo tem evoluído em muitas partes do mundo, inclusive em país fronteiro (Argentina), continuamente para a formas mais virulentas, ocasionando perdas produtivas, mesmo em plantéis vacinados.

### **Introdução**

Nos últimos anos, as mudanças nas práticas de criação intensiva das aves na indústria avícola 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.

## 1. Características moleculares

O vírus da doença de Marek (MDV) é classificado como *Gallid Herpesvirus 2*, no gênero *Mardivirus* da subfamília *Alphaherpesvirinae* (HASSANIN; ABDALLAH; EL-ARABY, 2013). MDV 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 é também chamado de herpesvírus dos perus-HVT- (FC126). Somente o MDV-1 é capaz de induzir a doença em galinhas, enquanto MDV-2 e MDV-3 são avirulentos sendo, então, utilizados como vacinas. 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 I (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), gene VIL-8 e pp38 (Tabela 1).

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).

Tabela 1: Principais genes envolvidos na oncogenicidade do MDV

Sorotipo	Estirpe	Nível de virulência	Gene vTR <sup>h,i,j</sup>	Gene VII8	Gene pp38	Oncogene Meq
1	GA <sup>a</sup>	Virulenta	+	+	+	+
1	Md5 <sup>b</sup>	Muito virulenta	+	+	+	+
1	Md11 <sup>c,d</sup>	Muito virulenta	+	+	+	+
1	RISPENS/CV1988 <sup>d</sup>	Atenuada	+	+ /NF	+ /NF	+ /NF
2	SB-1 <sup>e</sup>	Não oncogênica	-	+ /NF	+ /NF	-
3	HVT <sup>f</sup>	Não oncogênica	-	-	-	-

vTR: Telomerase viral; VII8: Interleucina viral 8; pp38: Fosfoproteína 38; +: presente; -: ausente; NF: Presente mas não funcional;

<sup>a</sup> Lee et al., 2000a,b; <sup>b</sup> Tulman et al., 2000; <sup>c</sup> Niikura et al., 2006; <sup>d</sup> Spatz et al., 2007; <sup>e</sup> Spatz; Schat, 2011; <sup>f</sup> Kingham et al., 2001; <sup>g</sup> Wilson; Coussens, 1991; <sup>h</sup> Fragnet et al., 2003; <sup>i</sup> Fragnet et al., 2005; <sup>j</sup> Trapp et al., 2006;

Adaptado de McPHERSON; DELANY, 2016

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 sorotipos 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 CVI988, 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. O aumento da virulência**

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 parálitica 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 (Figura 1).

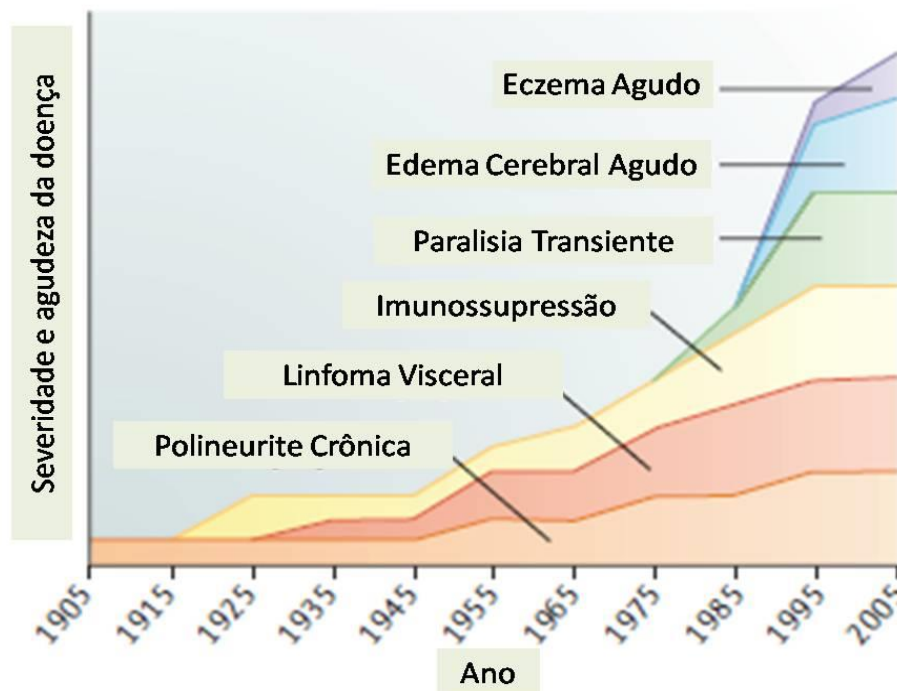


Figura 1. Aumento da virulência de MDV desde a descrição da doença de Marek. Em 100 anos a doença clínica mudou, a forma polineurite (clássica) foi prevalente até 1925, ano da descrição da forma aguda, caracterizada por linfomas viscerais, permanecendo ambas até 1950, quando tumores mais agressivos de desenvolvimento mais rápido foram descritos. Durante os últimos 25 anos, a virulência de MDV continuou a aumentar, embora continuem prevalentes as formas clássica e aguda, com novas formas que incluem edema grave cerebral e morte aguda em aves vacinadas (Adaptado de OSTERRIEDER et al., 2006).

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; Sharma; Fadly (1980), Eidson et al. (1981), Schat; Calnek; Fabricant (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 (WOZNIAKOWSKI; 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; Marchi; Rosi (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; NERVI; RISSO, 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 galimhas, 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 essa condizente com estirpes de baixa virulência.

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 dezoito 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.



## **CAPÍTULO III – INTERAÇÃO DO VÍRUS DA DOENÇA DE MAREK COM OUTROS AGENTES IMUNODEPRESSORES**

### **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 das infecções em aves. Ainda mais relevante, as infecções múltiplas podem ser mais graves. Considerando que os frangos e galinhas submetidos à alta tecnificação de produção, com diversos fatores estressantes, os quais por si só podem desencadear um processo de imunodepressão, a existência de agentes infecciosos concomitantes adiciona fragilidade ao sistema de produção como um todo. Embora não intensificada, mas de forma semelhante, as coinfeções podem representar para a avicultura de subsistência, quadros de máxima gravidade, com grandes perdas.

### **Introdução**

A imunodepressão é uma importante consequência associada à MD, especialmente em aves jovens. A presença do vírus da anemia infecciosa das galinhas, afeta profundamente a competência imune das aves afetadas, com potencialização da patogênese relacionada ao MDV. Considerando a genética e o perfil sanitário, as linhagens de galinhas caipiras diferem amplamente das criações industriais. Os parâmetros produtivos são 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. Há comumente parasitismo, que pode ser extremo, incluindo vírus, bactérias, fungos e helmintos. Vacinas são raramente empregadas, permitindo a susceptibilidade a diversos organismos patogênicos. A subnutrição, muitas vezes relacionada a diversos nutrientes, pode contribuir para a susceptibilidade e imunodepressão, especialmente a 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 um papel na susceptibilidade destes plantéis.

#### **1. Vírus da Doença de Marek e Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas**

A anemia infecciosa das galinhas (CA), causada pelo vírus da CA (CAV), é uma das principais doenças imunossupressoras que ocorrem em galinhas (SCHAT; VAN SANTEN, 2013). Esta atinge

principalmente aves jovens, podendo afetar também aves de outras idades, sendo caracterizada por severa anemia, atrofia generalizada de órgãos linfóides, retardo no crescimento, imunodepressão e mortalidade variável (Schat e Van Santen, 2008).

A via fecal-oral constitui provavelmente o principal modo de transmissão horizontal (SCHAT, 2003), sendo que a transmissão vertical também é possível (CARDONA et al., 2000). A seroconversão de galinhas sem a presença de vírus detectável em torno do início da postura sugeriu que CAV poderia manter-se de forma latente nos órgãos reprodutivos em baixos níveis de replicação, podendo o vírus ser reativado quando o animal atinge a maturidade sexual (MILLER;SCHAT, 2004; CARDONA et al., 2000; MILLER et al., 2008).

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 vantagem nestas coinfeções (DAVIDSON; RAIBSHTEIN; AL-TOURI, 2013), incluindo helmintoses, tumores por outras etiologias, como retrovíroses, e especialmente as coccidioses (BIGGS et al., 1969), ocasionando ainda maior perturbação no 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).

Acredita-se que a infecção pelo CAV em aves com mais de três semanas de idade pode apresentar pouco efeito adverso, embora a maioria dos surtos de MD apresentem coinfeção com CAV (HARIDY et al., 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; FEHLER; 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). Foram descritas coinfeções com estirpes de MDV de alta virulência e altíssima virulência (WITTER; SHARMA; FADLY, 1980; BUSCAGLIA; NERVI; RISSO, 2004). Segundo Haridy et al. (2009), CAV potencializa a mortalidade induzida pelo MDV, pois há indução da imunodepressão. Os autores avaliaram aves inoculadas com estirpes de MDV de alta virulência e desafiadas a partir da quarta semana de vida com CAV, descrevendo altas taxas de mortalidade, especialmente após a quarta semana pós infecção, com o sistema imune gravemente impactado.

## 2. Vírus da doença de Marek e *Mycoplasma gallisepticum*

No Brasil, a história da micoplasmose aviária teve início em meados da década de cinquenta, quando esta doença foi relatada pela primeira vez em São Paulo, com a descrição de casos de aerossaculite em galinhas e sinusite infecciosa em perus (REIS; NÓBREGA, 1955).

A palavra micoplasma tem sua origem no grego: *mykes*, que significa fungos, e *plasma*, que diz respeito à forma ou ao molde das células (KLEVEN, 2008). A ausência da parede celular evidencia plasticidade em sua morfologia, dependendo de seu estágio fisiológico (TIMENETSKY, 2009); além de torná-los naturalmente resistentes aos antibióticos os quais atuam impedindo a síntese da parede celular das bactérias, a exemplo das penicilinas (RAZIN; TULLY, 1995).

*Mycoplasma gallisepticum* (MG) é uma bactéria extracelular e infecta a superfície do epitélio respiratório e da conjuntiva das aves (NUNOYA et al., 1995; LEY, 2008). Amostras patogênicas têm capacidade de adesão e invasão celular, podendo se disseminar para outros órgãos e tecidos levando a uma doença sistêmica (LEY, 2008). Apesar da ausência de parede celular, podem sobreviver sob forma desidratada por vários dias, desde que protegidos da luz solar (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

Os micoplasmas possuem características como formato cocóide, cocobacilar ou pleomórficos, medem de 200-300 nm em diâmetro, são Gram negativos, mas se coram pelo Giemsa ou outros corantes similares, e possuem a capacidade de reter o corante de Dienes ao contrário das outras bactérias. São organismos de crescimento lento que normalmente requerem 3 a 5 dias para a formação de colônia mesmo quando adaptados ao cultivo em laboratório (JÚNIOR; MACARI, 2000).

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.

O período de incubação da micoplasmose por MG depende da virulência da estirpe (LOCKABY; HOERR, 1999), da concentração, dos fatores de estresse ambiental e do manejo dos lotes de aves (YODER; DRURY; HOPKINS, 1977). Geralmente é de onze a vinte e um dias após a exposição pelo contato direto. Em aves infectadas pela transmissão vertical o período de incubação pode ser mais curto e já foram relatados casos de sinusite em pintinhos com seis dias de idade. A transmissão de MG pode ocorrer de forma horizontal mediante o contato direto com secreções respiratórias, ou verticalmente pelo oviduto. A transmissão vertical é, entretanto, uma das principais razões para a dificuldade em controlar e erradicar a enfermidade (CERDÁ, 2007).

As manifestações clínicas de MG são tosse, corrimento, descarga ocular e nasal, decréscimo no consumo de alimentação, retardo de crescimento e lotes desiguais, além de queda na produção de ovos e

mortalidade variável (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). Em aves jovens, os sinais clínicos podem se manifestar por uma ligeira conjuntivite e uma quantidade muito pequena de secreção nasal de natureza serosa. Pode haver colabamento das pálpebras em função da conjuntivite e secreção. Ruídos respiratórios também podem ser percebidos. As aves diminuem o consumo de ração, com diminuição da conversão alimentar (MENDES; NAAS; MACARI, 2004).

As perdas econômicas atribuídas às micoplasmoses, principalmente por *Mycoplasma synoviae*, estão associadas à queda na postura e qualidade do ovo, à má eclodibilidade (altas taxas de mortalidade embrionária e refugos), à queda na eficiência alimentar, às altas taxas de mortalidade e condenação de carcaças nas aves de corte; e do alto custo com medicamentos e programas de controle, além do efeito sinérgico quando associados à outras doenças (NASCIMENTO et al., 2005).

Nas décadas de 60 e 70 no Estado de Minas Gerais a partir de estudos delineados para se conhecer a situação das aves contaminadas com MG, encontrou-se prevalências deste microorganismo em 25,7% dos lotes avaliados através de isolamento e 32,8%-33,4% através de testes sorológicos (RESENDE et al., 1968; REIS et al., 1973). Em galinhas com sinais de sinovite, a morbidade varia de 2 a 75%, sendo mais freqüente a variação de 5 a 15%, e mesmo com a totalidade de aves infectadas a morbidade com sinais respiratórios é baixa, a letalidade não ultrapassa 1% (BUCHALA et al., 2006). Em perus, a morbidade varia entre 1 e 20%, a letalidade é alta e acompanhada de canibalismo (YODER JUNIOR, 1997). No Brasil, existem relatos do aumento das condenações de aves em abatedouros pela presença de aerossaculite, que na sua maioria, pode ser decorrente de infecção pelo MG (MINHARRO et al., 2001; BRANCO, 2004).

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 fatores estressantes como superlotação, competição social, canibalismo, má nutrição e parasitismo, fazendo com que o sistema imune da ave afetada não consiga debelar a infecção.

### **3. Vírus da doença de Marek e *Avibacterium paragallinarum***

O agente da coriza infecciosa das galinhas foi primeiramente relatado por De Blicke (1932) na Holanda e por Nelson (1933) nos Estados Unidos. O agente etiológico causador da coriza infecciosa (CI) foi mais recentemente reclassificado para *Avibacterium paragallinarum*, até 2005 era denominado de *Haemophilus paragallinarum*. *A. paragallinarum* é uma bactéria da família *Pasteurellaceae*, sendo um bacilo curto (0,3-0,6 x 1-3 mm), Gram negativo, imóvel, com coloração bipolar, com tendência ao pleomorfismo e à formação de filamentos, após 24-48 horas de cultivo. Não forma esporos, mas pode ser encapsulado, especialmente no caso de algumas cepas mais virulentas. É mesófilo e facultativamente

aeróbico, com pronunciada microaerofilia (cresce relativamente bem em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub>), mas também é capaz de crescer em condições de anaerobiose ou microaerofilia (baixa tensão de O<sub>2</sub>) (LIMA; ANDREATTI, 2006).

É um microrganismo delicado que é inativado rapidamente fora do hospedeiro. Quando presente no exsudato infectado suspenso em água, é inativado em cerca de 4 horas, à temperatura ambiente, enquanto que em exsudatos e tecidos de aves mortas infectadas, pode sobreviver por vinte e quatro horas ou até por quarenta e oito horas (37°C), podendo permanecer viável por vários dias à 4°C (BLACKALL; MATSUMOTO, 2003).

A coriza infecciosa 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 plantéis 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.

No Brasil, a prevalência de coriza infecciosa indica ocorrer em todos os estados, especialmente aqueles com maior tradição em produção avícola, das regiões sul e sudeste (LIMA; ANDREATTI, 2006). Essa enfermidade desencadeia prejuízos econômicos, principalmente, advindos da diminuição do desempenho do lote e uma redução acentuada (10- 40%) na produção de ovos (BLACKALL; MATSUMOTO, 2003).

A doença ocorre com maior frequência em locais onde há criação intensiva, sem preocupação com o esvaziamento total das instalações e sem adoção de um adequado vazão sanitário após a saída de um lote, situação essa não tão incomum à realidade do setor de aves de postura do Brasil (GAMA; NASCIMENTO, 2000). A galinha (*Gallus gallus domesticus*) é a espécie naturalmente mais suscetível ao agente da coriza infecciosa, com todas as idades sensíveis, mas atingindo com maior severidade aves na puberdade, com mais de treze semanas de idade, as quais apresentarão um período de incubação mais curto e uma duração clínica mais longa da doença. As aves jovens, embora passíveis de adquirir a infecção, são bem menos suscetíveis à CI e há uma certa resistência demonstrada em pintos de até sete dias de idade (FERREIRA; KNÖBL, 2000).

A transmissão é essencialmente horizontal, sendo que aves infectadas de forma crônica, assim como aves portadoras assintomáticas são importantes fontes de infecção. O agente etiológico pode ser transmitido por aerossol, moscas, contato direto entre aves das gaiolas, contato entre aves infectadas com fômites e, principalmente, através da água contaminada de bebedouros. A contaminação da água ocorre pela

passagem do corrimento nasal e ocular de aves infectadas para a água. A água por sua vez irá permitir a infecção das aves sensíveis, tornando-se a principal forma de transmissão da coriza infecciosa (CASTRO, 2000).

As cepas patogênicas de *A. paragallinarum* aderem-se firmemente ao epitélio da mucosa ciliada do trato respiratório superior das aves. O processo patológico da coriza infecciosa continua por edema e hiperemia por infiltração de heterófilos na lâmina própria das membranas, evoluindo para hiperplasia, desintegração e descamação dos epitélios das cavidades nasais, dos seios infra e periorbitais e da traqueia. Essas alterações são responsáveis pelos sinais clínicos obstrutivos das vias respiratórias superiores. Esse processo tem início a partir do 20ª hora pós-inoculação intranasal, passando por um máximo de severidade ao redor do 7º ao 10º dia pós-infecção (PI), com marcada redução e reparação ocorrendo a partir do 14º até 21º dia PI (BLACKALL; MATSUMOTO, 2003).

A presença de cápsula protege a bactéria da ação bactericida do soro normal, sendo também antifagocítica, associada à presença de antígeno hemaglutinante, tem um papel importante na colonização. Toxinas liberadas pelo organismo durante sua proliferação, principalmente a partir da cápsula, além de outros antígenos associados à virulência, são relacionadas à produção de lesões na mucosa, descamação e ao aparecimento de sinais clínicos. Entre estes antígenos destacam-se o lipopolissacarídeo do corpo bacteriano, responsável pela reação inflamatória, e o polissacarídeo e o ácido hialurônico, presentes na cápsula, os quais serão responsáveis pelos sinais clínicos. A migração ao trato respiratório inferior (pulmões e sacos aéreos) não é comum na CI, podendo ocorrer especialmente quando houver um sinergismo com outros agentes infecciosos, com fatores ambientais desfavoráveis ou doenças imunossupressoras (SIQUEIRA, 2006).

O período de incubação da coriza infecciosa é de curta duração (24 a 48 horas) após inoculação intranasal ou intrasinusal com cultura pura ou exsudato. Aves suscetíveis expostas ao contato com aves infectadas usualmente apresentam sinais da doença em vinte e quatro a setenta e duas horas, podendo a incubação durar até dez dias, em casos excepcionais (LIMA; ANDREATTI, 2006).

A morbidade e a mortalidade dependem da virulência do agente, geralmente apresentando uma morbidade alta e com difusão rápida. A mortalidade, no entanto, é baixa, com exceção de algumas cepas altamente patogênicas. O curso clínico da doença poderá ser de duas a três semanas, podendo fatores como mau manejo, susceptibilidade de diferentes linhagens de aves e a possibilidade de ocorrência da CI complicada por outra(s) doença(s) (bronquite infecciosa, laringotraqueíte, micoplasmose) aumentar a severidade, a duração e a mortalidade (COUTO et al., 2016; CRITTER et al., 2006).

Duas formas de coriza infecciosa ocorrem comumente, a CI descomplicada, por infecção exclusiva com *A. paragallinarum* e a CI complicada, onde além do principal agente, tem-se a participação de outros agentes patogênicos, como micoplasmas, vírus da laringotraqueíte. *Avibacterium gallinarum* em coinfeção pode também resultar em lesões quase idênticas à CI exclusiva (BYARUGABA et al, 2006).

Não há relatos de co-infecção do vírus da doença de Marek com *Avibacterium paragallinarum*, sendo que a campo a interação desses microrganismos, assim como com outros agentes virais e bacterianos ocorre rotineiramente. No entanto, é desconhecido o possível papel imunodepressor que a coriza infecciosa teria em um cenário de co-infecção com a doença de Marek. Desta forma, pesquisas frente o papel da coriza infecciosa das galinhas em relação à doença de Marek fazem-se necessárias, visto que, é sabido que *Avibacterium paragallinarum* está presente virtualmente em plantéis avícolas industriais, assim como, e principalmente, na avicultura fundo-de-quintal.

#### **4. Vírus da doença de Marek e *Chlamydia psittaci***

A clamidiose é uma zoonose causada pela bactéria cosmopolita, Gram-negativa, e intracelular obrigatória *Chlamydia psittaci*, recentemente reclassificada (ex-*Chlamydophila psittaci*). A doença acomete humanos e aves, principalmente, os psitacídeos e os pombos (KALETA; TADAY, 2003). As estirpes de *C. psittaci* podem ser atualmente classificadas em nove genótipos, dos quais sete estão associados às aves (A-F, E/B) e dois associados a mamíferos (WC e M56). A maioria dos genótipos aviários já foi identificada em casos de transmissão zoonótica para humanos, principalmente A, B e E/B (SACHSE et al., 2009). Em humanos, a doença causada por *C. psittaci* é denominada psitacose, pela associação com papagaios, e pode apresentar um quadro clínico grave, normalmente com envolvimento do trato respiratório superior, o que a torna uma doença de relevância à saúde pública (HARKINEZHAD, GEENS; VANROMPANY, 2009a).

Todas as espécies pertencentes ao gênero *Chlamydia* são patógenos de grande significado na medicina veterinária, pois são apontados como agentes potencialmente zoonóticos. Animais que estão infectados pela forma latente, assintomáticos por um longo período são particularmente perigosos para a saúde humana. Infecções latentes por *Chlamydia* ocorrem em condições naturais em aves, sendo que uma relação equilibrada entre o hospedeiro e o microrganismo tende a não causar danos ao hospedeiro. No entanto, ocasionalmente, a bactéria pode ser excretada e em condições desfavoráveis infectar um novo hospedeiro (VANROMPANY, 2009a).

A maior parte das aves torna-se cronicamente infectada e assintomática, desenvolvendo sinais clínicos quando submetidas a estresse, sendo que os mais frequentes são hiperemia na conjuntiva ocular, anorexia, letargia, diarreia, ocasionalmente choque e morte (RASO, 2006; HARKINEZHAD, GEENS; VANROMPANY, 2009a). De modo geral, as aves infectadas, mesmo sem demonstrar sinais clínicos da enfermidade, eliminam o microrganismo nas fezes, na urina, no muco orofaríngeo e nas secreções lacrimais e nasais, por um longo período e de forma intermitente, contaminando o ambiente e disseminando a infecção para outras aves, mamíferos e/ou seres humanos. O microrganismo pode sobreviver por períodos longos em fezes e secreções secas (RASO, 2007).

Tendo em vista a importância desse agente infeccioso em aves produção, mas principalmente para galinhas da avicultura de subsistência, devido a sua maior proximidade com os seres humanos, faz-se

fundamental o diagnóstico precoce desta enfermidade, objetivando com isso minimizar os riscos oferecidos aos seres humanos.

Partindo do princípio que nenhuma doença ocorre de maneira isolada no organismo animal, um dos principais pontos a serem considerados na infecção por *C.psittaci* é a possibilidade de que a co-infecção com outro agente infeccioso possibilite o exacerbamento do quadro clínico-patológico e aumento da excreção. Partindo do princípio que a possibilidade de infecção simultânea entre MDV e *C. psittaci* até o momento não foi abordada na literatura, faz-se necessário aprofundar as pesquisas sobre a ocorrência e, eventualmente, analisando infecções experimentais para determinar a relação entre os microrganismos, assim como explorar o potencial papel imunodepressor da *C.psittaci* em uma co-infecção com o MDV.

Estudos relatam a ocorrência de *C. psittaci* em um grande número de animais domésticos e selvagens (DI FRANCESCO et al., 2012). As aves silvestres, especialmente da ordem Psittaciformes, são consideradas os principais reservatórios e transmissores de *C.psittaci* para as aves domésticas. O agente é excretado nas fezes e em descargas nasais, principalmente quando a ave infectada é submetida a estresse e imunodepressão, decorrente de deficiência nutricional, transporte prolongado, superlotação, mudança de temperatura, aspectos fisiológicos como reprodução e disputas sociais, e infecção interveniente. Estes fatores podem resultar em manifestação ou agravamento dos sinais clínicos da doença, ao tempo que incrementam a eliminação da bactéria, potencializando a transmissão do agente para novos hospedeiros susceptíveis (RASO et al., 2004).

A transmissão ocorre principalmente por inalação de poeira e aerossóis e, com menor frequência, por ingestão de água ou alimentos contaminados com fezes e secreções respiratórias eliminadas por animais infectados (SMITH et al., 2010). Acredita-se que a infecção embrionária geralmente cause a morte do embrião. Entretanto, em títulos menores de infecção, pode haver desenvolvimento completo e eclosão, dando origem a um filhote infectado, tendo como a principal fonte de contaminação a mucosa do sistema reprodutor da mãe (ANDRESEN; FRANSON, 2007; RODOLAKIS; MOHAMAD, 2009).

A clamidiose aviária é uma doença de notificação obrigatória aos órgãos de saúde pública na Austrália, nos Estados Unidos e na maioria dos países da União Européia (HARKINEZHAD, GEENS; VANROMPANY, 2009a). O Brasil está em conformidade com a norma sanitária estabelecida pela OIE e deve fazer a notificação de casos confirmados em laboratório (BRASIL, 2012).



## CAPÍTULO IV - MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Laboratório

O projeto de pesquisa foi desenvolvido no Setor de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Para os exames *post mortem* foram usadas as estruturas da sala de necropsias do setor. O laboratório de biologia molecular (C215), em cabine de fluxo laminar vertical (Trox, Brasil) foi utilizado para as preparações das misturas para reações de PCR. Para a termociclagem e eletroforese foi utilizada sala exclusiva para materiais amplificados (C214). Os sequenciamentos dos produtos das reações em cadeia pela polimerase (PCR) foram realizados no Laboratório de Genética Animal da Escola de Veterinária, Departamento de Zootecnia da UFMG.

### 2. Comitê de ética

Este projeto de pesquisa foi previamente apresentado e teve seu início somente após a aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA), podendo desta forma ser identificado através do protocolo 153/2016 (Anexo A)

### 3. Amostras clínicas

Galinhas provenientes da rotina de diagnóstico laboratorial do Setor de Doenças das Aves (Escola de Veterinária da UFMG), no período de 2008 a 2016, tendo origem tanto da avicultura industrial quanto da avicultura de subsistência foram utilizadas para a pesquisa do oncogene *meq* de MDV. A maioria das aves analisadas apresentava patologias variadas, sendo que grande parte delas exibia sinais clínicos característicos da doença de Marek, sendo que paralisia uni ou bilateral, cegueira, emagrecimento progressivo devido a dificuldade de locomoção, queda na postura são os sinais clínicos mais recorrentes. Os tecidos recolhidos e utilizados para extração do material genético foram os seguintes: baço, timo, fígado, pele (fóliculo da pena) nervos periféricos (ciático e braquial), bursa de *Fabricius*, músculo peitoral e pró-ventrículo.

### 4. Extração do DNA

A extração do DNA dos tecidos foi realizada pelo método de sílica e iodeto de sódio, seguindo o protocolo de Boom; Sol; Salimans (1990) com as seguintes modificações. A extração foi realizada por

meio da reação do material bruto previamente macerado (200  $\mu$ L), com aproximadamente 700  $\mu$ L 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 foi coletada com o auxílio de uma pipeta e colocada em um novo tubo. Junto com 40  $\mu$ L 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 (converter para xg), o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo.

O sedimento (DNA ligado a 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. Foi adicionado 1 mL de acetona e após homogeneização no vórtex e centrifugação por 60 segundos a 13500 rpm, o sobrenadante foi 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  $\mu$ L 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 tubo 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.

## 5. Oligonucleotídeos iniciadores

As reações para vírus da doença de Marek (MDV), vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV), *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Chlamydia psittaci* (CP) e *Avibacterium paragallinarum* (AP) foram desenvolvidas utilizando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 1. Para a realização do PCR diagnóstico para o vírus da doença de Marek foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por 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. (2009b) 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; FRANSON, 2007).

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

Gene	Primer senso	Primer consenso	Segmento (pb)	Referência
MDV <i>meq</i>	5'-TGTTGCGGATCCTCGTAAGA-3'	5'-AGTTGGCTTGTCATGAGCCAG-3'	583 - 763	MURATA et al., 2013
CAV VP1	5'-GACTGTTAAGATGGCAAGACGAGCT-3'	5'-GGCTGAAGGATCCCTCCATTC-3'	692	TODD et al., 1992
MG 16s	5'GAGCTAATCTGTAAAGTTGGTC 3'	5' GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC 3'	186	OIE, 2008
CP <i>Omp-A</i>	5'-ACTACGGAGATTATGTTTCGATCGTGT-3'	5'-CGTGCACCTACGCTCCAAGA-3'	400	SACHSE et al., 2009 a
AP HPG-2	5'-TGAGGGTAGTCTTGCACGCGAAT-3'	5'-CAAGGTATCGATCGTCTCTCTACT-3'	500	CHEN et al., 1996

Notas: MDV: vírus da doença de Marek; CAV: vírus da anemia infecciosa das galinhas; MG: *Mycoplasma gallisepticum*; CP: *Chlamydia psittaci*; AP: *Avibacterium paragallinarum*

Para a realização do PCR diagnóstico de *Mycoplasma gallisepticum* foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores descritos pela OIE (2008), visto que .....

Na PCR para detecção do vírus da anemia infecciosa das galinhas, foram utilizados os oligonucleotídeos descritos por Todd et al.(1992), que flanqueiam um fragmento de 692 pb de um gene que codifica a proteína do capsídeo de CAV.

## 6. Condições da reação em cadeia pela polimerase para detecção do Vírus da Doença de Marek, Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas, *Mycoplasma gallisepticum*, *Chlamydia psittaci* e *Avibacterium paragallinarum*

Tabela 3: Condições da PCR para os agentes infecciosos avaliados nesse estudo

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 <sub>2</sub> , 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 5X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl), 1µl de dNTPmix a 10 mM , 1,5mM de MgCl <sub>2</sub> , 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 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>	200ng de DNA, 10µL de tampão 5X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl – Invitrogen), 1µL de dNTPmix a 10mM (dATP,dTTP, dCTP e dGTP - Invitrogen), 2µL deMgCl <sub>2</sub> a50mM (Invitrogen), 1µL de cada iniciador externo a 10pmol, 0,3µL de Taq Polimerase a 5U/µL ( <i>Platinum</i> Taq DNA Polymerase – Invitrogen) e água ultra puraq.s.p.Volume final: 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 foi submetido à etapa de extensão final por 5 minutos a 72°C.
<i>Chlamydia psittaci</i>	1 µL de DNA, 4µL de tampão 5X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl – Invitrogen), 1µL de dNTPmix a 10mM (dATP,dTTP, dCTP e dGTP - Invitrogen), 2,0µL deMgCl <sub>2</sub> a50mM (Invitrogen), 1µL de cada iniciador externo a 10pmol, 0,3µL de Taq Polimerase a 5U/µL ( <i>Platinum</i> TaqDNAPolymerase – Invitrogen) e água ultra puraq.s.p.Volume final: 25 µL	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 foi submetido à etapa de extensão final por 7 minutos a 72°C.
<i>Avibacterium paragallinarum</i>	1,5 µL de DNA, 5µL de tampão 5X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl – Invitrogen), 0,5µL de dNTPmix a 10mM (dATP,dTTP, dCTP e dGTP - Invitrogen), 1,5µL deMgCl <sub>2</sub> a50mM (Invitrogen), 2µL de cada iniciador externo a 10pmol, 0,3µL de Taq Polimerase a 5U/µL ( <i>Platinum</i> TaqDNAPolymerase – Invitrogen) e água ultra puraq.s.p. Volume final de 23,5µl.	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 foi submetido à etapa de extensão final por 7 minutos a 72°C.

## 7. Análise dos produtos amplificados

A visualização dos produtos das PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5X (100mM Tris-base pH8,3, 25 mM EDTA e 50 mM ácido bórico). Por amostra foram utilizados 8 µL do produto amplificado, e adicionados 2 µL do tampão de amostra 2X (60% de glicerol, 10% de TBE 10X e azul de bromofenol). A eletroforese foi efetuada a 110V por 50 minutos, sendo utilizado o padrão de tamanho molecular de 100 pb DNA Ladder (Promega). Imediatamente após a corrida, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo na concentração de 10mg/mL e os resultados foram visualizados em um transiluminador UV (Macrovue, Hoefer/Pharmacia, EUA).

## 8. Sequenciamento genético das sequencias de MDV

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o protocolo de Rosenthal; Coutelle; Craxton (1993), onde o produto (50µL) será adicionado igual volume de uma solução ao 20% de PEG 8000, com agitação por 15 s, incubação por 15 min a 37 °C e centrifugação (15 min 13000xg). O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado por centrifugação (5 min) duas vezes com etanol 80% (125 µL, adição lenta). Após secagem do etanol (37°C), 10-15 µL de água ultra pura foram adicionados e o sedimento suspenso por pipetagem. O DNA foi quantificado (Nano Vue, EUA) e visualizado após eletroforese em gel de agarose 1,5% (em TBE, 1X). Os produtos amplificados e purificados foram submetidos à sequenciamento pelo método de dideoxynucleotídeos (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), em um sequenciador

automático capilar ABI 310® (Perkin Elmer, Estados Unidos), utilizando o kit Big Dye Terminator Mix (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as indicações do fabricante.

#### **9. Análise das sequências nucleotídicas de MDV**

A análise da qualidade das sequências foi realizada utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999). Este programa permite editar e excluir erros de bases por ambiguidades, e identifica picos duplos dos eletroferogramas do sequenciamento. Todos os alinhamentos foram revisados e editados manualmente quando necessário. O alinhamento das fitas sequenciadas foi realizado para se obter a fita de consenso.

#### **10. Busca das sequências similares ao MDV**

Todas as sequências de MDV obtidas foram comparadas com sequências disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando os algoritmos dos programas BLAST 2.0 (*Basic Local Alignment Search Tool*), BLASTn e BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), para a busca de similaridade entre os nucleotídeos e aminoácidos deduzidos (ALTSCHUL; MADDEN; HAFFER, 1997).

As sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos de MDV foram alinhadas com as sequências de depositadas no GenBank com o auxílio do programa Clustal X (THOMPSON; GIBSON; PLEWNIAK, 1997), o qual está implementado no programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA 5.0/ [www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) versão 5.0 para Windows e no programa BioEdit.

A análise filogenética dos nucleotídeos e dos aminoácidos deduzidos de MDV foi realizada utilizando o método *neighbor-joining*, com o programa MEGA 5.0. Os dados foram submetidos ao teste de confiança em topologia (*Bootstrap*) com 1000 reamostragens, para testar a confiabilidade dos agrupamentos obtidos nas árvores filogenéticas, com o método de substituição de nucleotídeos Kimura 2- parâmetro (KIMURA, 1980) e o método de substituição de aminoácidos JTT (JONES; TAYLOR; THORNTON, 1992a). O programa MEGA 5.0 permitiu a análise das sequências, assim como fez a recomendação do melhor método para a análise filogenética.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Detecção do DNA do vírus da doença de Marek

Com o presente estudo foi possível identificar a presença do vírus da doença de Marek tanto em galinhas pertencentes a avicultura industrial quanto em aves da avicultura de subsistência. Entre as duzentos e onze aves examinadas, vinte e oito (28/211; 13,3%) pertenciam a avicultura industrial e as outras cento e oitenta e três (183/211) aves restantes (86,7%) pertenciam à avicultura de subsistência. O maior número de aves do último grupo deve-se principalmente à rotina laboratorial do Setor de doenças das aves da Universidade Federal de Minas Gerais, onde a maior parte das aves atendidas é originária da avicultura familiar, visto que a maioria das granjas avícolas possuem atendimento veterinário já estabelecido. Dentre o total de aves analisadas, foi possível detectar através da reação em cadeia da polimerase a presença do MDV em cento e doze galinhas (112/211; 53%). Entre as quais, onze aves (11/; 211 5%) pertencentes à avicultura industrial apresentaram resultado positivo para o MDV, já da avicultura de subsistência, esse número expande para cento e uma (101/211) aves positivas para MDV (48%) (Figura 2).

## Galinhas da avicultura industrial e familiar positivas para MDV

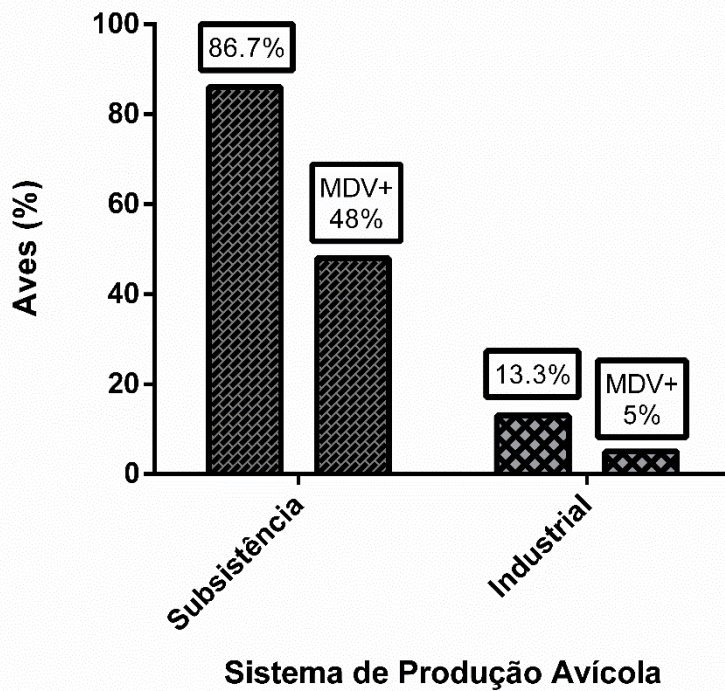


Figura 2: Representação da relação entre o total de aves amostradas, estratificadas por sistema de produção, e aves positivas de cada grupo para a doença de Marek.

Do total de cento e doze ( $n=112$ ) galinhas positivas para o MDV, onze aves ( $11/112$ ; 9,8%) pertenciam a avicultura industrial, sendo as demais cento e uma ( $101/112$ ) aves positivas (90,2%) (Figura 3) para MDV originárias da avicultura de subsistência de Belo Horizonte e região metropolitana.

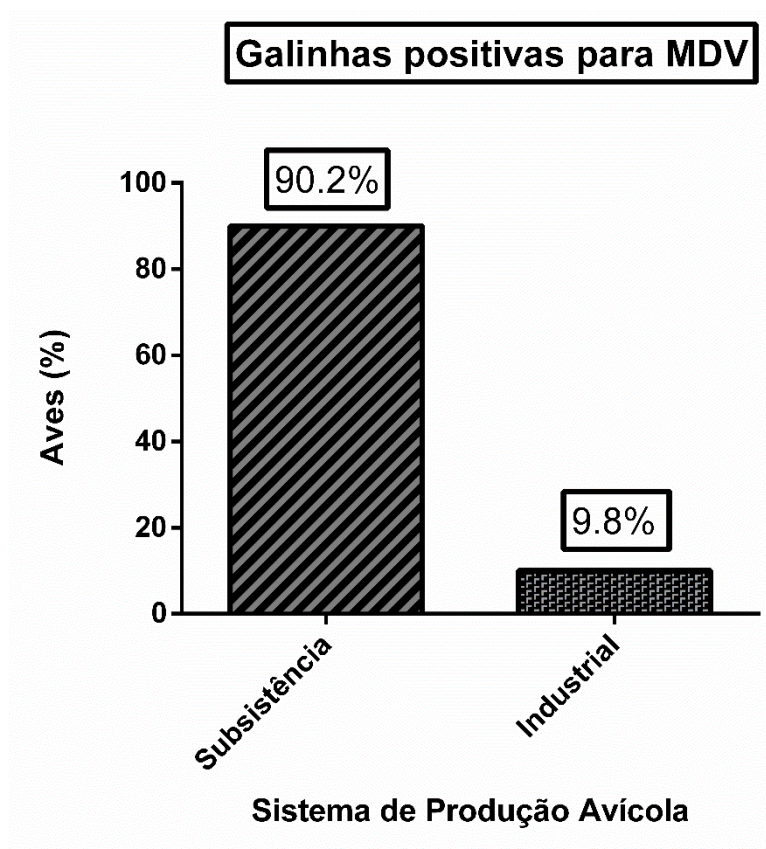


Figura 3: Representação do total de aves positivas para a presença do vírus da doença de Marek, estratificadas conforme o sistema de produção avícola.

As criações de galinhas da avicultura não tecnificada, incluindo familiar e de subsistência, não dispõem de atendimento veterinário adequado e enquadram-se em categoria na qual a doença de Marek é subnotificada ou, principalmente, não notificada aos órgãos oficiais. Considera-se que a ocorrência de variantes de MDV em galinhas da avicultura de subsistência ou familiar não será conhecida pelo sistema oficial de vigilância, tornando-se evidente o risco para a avicultura industrial.

A pesquisa de MDV em galinhas da avicultura de subsistência e familiar preenche importante lacuna de conhecimento epidemiológico em Minas Gerais, de possível relevância nacional. Os dados epidemiológicos obtidos da avicultura alternativa são estratégicos para o planejamento sanitário em avicultura tecnificada.

#### **Agentes infecciosos detectados em coinfeção com MDV**

Em nosso estudo foi avaliada a presença de algumas coinfeções nas aves positivas para a presença do MDV. Os agentes infecciosos pesquisados em co-infeção nesse estudo foram *Mycoplasma*



*gallisepticum*, *Avibacterium paragallinarum*, *Chlamydophila psittaci* e o vírus da anemia infecciosa das galinhas. Corroborando a hipótese das infecções múltiplas serem comuns, foi confirmada a existência de coinfeção do MDV com todos os microrganismos pesquisados. Dos cento e doze animais positivos para a MDV, setenta e cinco aves (67%) apresentaram coinfeção com um ou mais agentes infecciosos pesquisados. Analisando os resultados, pode-se evidenciar a coinfeção entre MDV e *Mycoplasma gallisepticum* (MG) em cinquenta e cinco aves (49,1%), entre MDV e *Avibacterium paragallinarum* (AP) em vinte e três aves (20,5%), entre MDV e *Chlamydophila psittaci* (CP) em dezoito aves (16%) positivas para os dois microrganismos, e duas aves (1,8%) positivas para MDV e o vírus da anemia infecciosa das galinhas. Aves que apresentaram coinfeção tripla por MDV, MG e CP foram doze (10,7%). Foram também demonstradas as co-infecções triplas de MDV, MG e AP em dez aves (9%). A coinfeção quádrupla entre MDV, MG, CAV, CP ocorreu em uma ave (0,9%). A coinfeção tripla entre MDV, AP e CP também ocorreu em uma galinha (0,9%) (Figura 4).

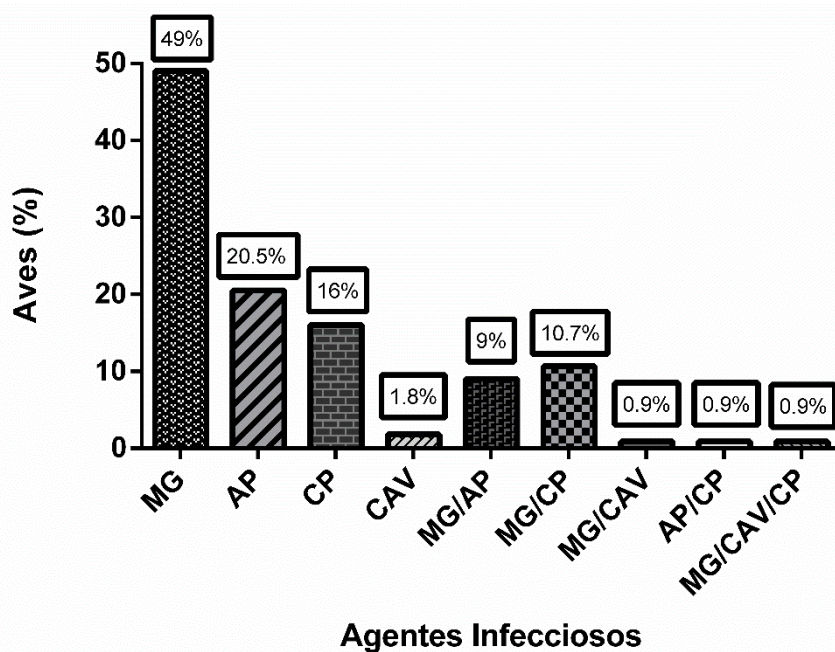


Figura 4: Relação dos agentes infecciosos em coinfeção com o vírus da doença de Marek em galinhas utilizadas no estudo, sendo MG( *Mycoplasma gallisepticum*), AP (*Avibacterium paragallinarum*), CP (*Chlamidophylla psittaci*), CAV ( Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas).

As infecções simultâneas ou coinfeções com vírus da doença de Marek (MDV) decorrem, principalmente, da forma como as galinhas industriais são criadas, ou seja, em alta densidade populacional onde as enfermidades, raramente, apresentam-se sozinhas (WITTER; SCHAT, 2003). Na maioria das vezes o médico veterinário busca apenas um diagnóstico para determinado problema quando, na verdade, ele está se deparando com vários agentes etiológicos superpostos que exigirão dele a

proposição de medidas específicas para cada etiologia identificada e, para que desta forma, o problema seja resolvido de maneira eficaz (SALLE et al., 2009).

Alguns autores defendem que a eficácia das vacinas contra a doença de Marek pode tornar-se prejudicada por infecções concomitantes com outros agentes imunossupressores (OTAKI et al., 1988; ROSENBERGER, 1983; SHARMA, 1984; WITTER et al., 1979). A hipótese é sustentada pelo fato de que, na maioria das vezes, uma doença não ocorre de forma isolada no organismo da ave, ou seja, um ou mais agentes infecciosos, poderiam potencializar a infecção por MDV e do agente em co-infecção. Buscaglia e Crosetti (1993) relataram falhas vacinais após a utilização de vacinas bivalentes e atribuem à infecção concomitante com o vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV), enquanto Landman e Verschuren (2003) relacionaram as falhas vacinais, ocorridas na Holanda, com a manipulação inadequada das ampolas de vacinas.

### **Presença do vírus da doença de Marek na avicultura industrial**

A vacinação para a doença de Marek, a única vacina obrigatória na avicultura brasileira, está disponível virtualmente exclusivamente para a avicultura tecnificada. Entretanto, a resposta imune à vacinação induz proteção que atua como pressão evolutiva de estirpes variantes, caracterizadas como estirpes de crescente virulência com o decorrer do tempo (DAVISON; VENUGOPAL, 2005; READ et al., 2015). As falhas vacinais podem também decorrer de erros na administração da vacina ou de subdosagem (LANDMAN; VERSCHUREN, 2003), visto que por algum tempo a diluição de vacina de Marek era rotina na indústria avícola.

No Brasil, as vacinas mais utilizadas são as liofilizadas contendo o herpesvírus de perus (HVT), por sua maior facilidade na conservação e manipulação. Entretanto, em muitos casos, as vacinas para a doença de Marek são associadas às células e por isso necessitam de cuidados especiais no manuseio, armazenamento, assim como em sua administração na ave como, por exemplo, utilizar o solvente indicado pelo fabricante, assim como a diluição correta da vacina, visando não aplicar uma subdosagem na ave, a qual não iria propiciar a imunidade esperada. (HALVORSON et al., 1979). Outros cuidados necessários com a vacina viva atenuada envolvem a homegeneização da vacina antes de aplica-la, visando com isso que todos os animais recebam a dose apropriada do imunógeno. Falhas na conservação da vacina sob refrigeração, condições de descongelamento impróprias e reconstituição em diluentes impróprios podem reduzir gravemente os títulos da vacina. Outros fatores, tais como combinação com antibióticos (COLWELL et al., 1975; EIDSON et al., 1978), administração conjunta com outras vacinas (ROSENBERGER, 1983), ou demora na vacinação após a reconstituição da mesma, pode também reduzir o título da vacina.

No entanto, um dos principais fatores que alteram o título vacinal sem sombra de dúvidas é a diluição das vacinas visando reduzir o custo da vacinação, sendo que essa é uma prática comum em todo o mundo, especialmente na indústria de frangos de corte. Além das doses mínimas que devem ser administradas, a eficácia da vacina também pode ser afetada pela potência da mesma (GIMENO et al., 2011). As formas de vacinação também abrem caminho para alguns questionamentos. A vacinação pode ser realizada no 18º dia embrionário ou no 1º dia após a eclosão do pinto. Alguns autores sustentam a teoria de que a exposição ao MDV no campo pode ocorrer dentro de alguns dias após a vacinação da ave em seu primeiro dia de vida, sendo que a imunidade conferida pela vacinação pode não estar completa (BASARAB et al., 1976). Dependendo da qualidade técnica da criação, que se reflete na qualidade sanitária (biossegurança, limpeza, desinfecção), em algumas granjas o desafio poderá ocorrer nas primeiras horas após a chegada. Ou seja, uma das melhores formas de proteger a ave contra o MDV é vaciná-la, portanto, quando ainda se encontra em fase embrionária.

Entre os diversos pontos que merecem destaque quando o assunto é avicultura industrial, dois, no entanto, se sobressaem que são, vazio sanitário e biossegurança das granjas avícolas. Entre a saída de um lote de aves, que chegou ao final de seu ciclo de produção, e a chegada do próximo lote, deve haver um intervalo de tempo, em torno de quinze a vinte dias, em que os galpões permanecem vazios. É o chamado vazio sanitário, que, quanto mais prolongado for, tanto melhor, sob o ponto de vista sanitário. Em criações de frangos de corte, principalmente, tem-se observado uma redução desse período de vazio sanitário, assim como uma deterioração geral na prática de limpeza e desinfecção dos galpões. A reutilização de uma mesma cama em lotes sucessivos e o uso de pisos de chão batido, nos galpões de frangos de corte, dificulta ou mesmo impede que seja feita uma boa desinfecção do ambiente (SALLE et al., 2009). Desta forma, a perpetuação de um agente etiológico em um mesmo ambiente é facilitada, e assim a doença acaba tornando-se algo crônico em aves as quais habitam o ambiente submetido a este tipo de limpeza.

Em termos gerais, a globalização propicia o rápido transporte de agentes infecciosos para locais distantes com grande facilidade, possibilitando desafios com agentes infecciosos emergentes ou re-emergentes para humanos, animais domésticos e às plantas de cultivo industrial. A biossegurança em uma granja avícola é essencial para que potenciais patógenos não sejam introduzidos. Os programas de biossegurança são essenciais, principalmente do ponto de vista preventivo, e visam proteger os plantéis avícolas através de um conjunto de medidas de segurança (ANDREATTI, 2006; RUI et al., 2011)

### **Presença do Vírus da doença de Marek na avicultura de subsistência**

As características da criação de galinhas de subsistência são determinantes de desafios por agentes de doenças atualmente raras ou inexistentes na avicultura industrial. Os resultados obtidos nesse grupo de aves eram assim já esperados. Outrossim, os parâmetros produtivos da avicultura de subsistência são raramente mensurados e na maioria dos casos extremamente baixos. Aves nessas criações dificilmente

recebem a nutrição adequada, além de não contar com acompanhamento sanitário efetivo. A reprodução ocorre ao acaso, sem escolha ou seleção de reprodutores e indiferente às infecções de transmissão vertical.

A existência de animais pertencentes a várias faixas etárias compartilhando o mesmo ambiente é outro fator que contribui para a perpetuação de um agente infeccioso em um sistema de produção como esse. Aves mais velhas apresentam o sistema imunológico maduro, com a resposta imune adaptativa aos patógenos que circulam entre as aves e outras classes animais. Entretanto, para alguns patógenos a infecção nas aves adultas pode ser assintomática e ocorrer o estado de portador persistentemente infectado, sendo que em muitos casos a infecção torna-se vitalícia. Os animais mais jovens apresentam o sistema imune imaturo, o que lhes confere usualmente maior suscetibilidade à primeira infecção, com invasão e colonização mais graves (WITTER; GIMENO, 2006).

É comum as aves da avicultura de subsistência apresentar extrema desnutrição, que resulta de inadequada dieta e parasitismo, que abrange vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos. Conforme comentado anteriormente, as múltiplas etiologias tendem ao agravamento das doenças com micoplasmose por *Mycoplasma gallisepticum* e coriza infecciosa (*Avibacterium paragallinarum*).

Na avicultura industrial, o Brasil está em conformidade às normas internacionais de saúde animal, definidas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), normas que estabelecem a notificação e erradicação obrigatórias de micoplasmoses por *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, estes em galinhas e perus, e *M. meleagridis* em perus, dos reprodutores de aves industriais (OIE, 2008). O Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) estabeleceu desde 1994 a legislação sanitária para o atendimento das exigências ao comércio internacional definidas pela OIE para os países signatários da Organização Mundial de Comércio (OMC). A legislação do PNSA define testes de triagem e confirmação laboratorial do status sanitário de reprodutores em controle permanente para as micoplasmoses (BRASIL, 2001). Embora o controle seja rigoroso para reprodutores, as micoplasmoses, assim como a coriza infecciosa, são comuns em determinadas regiões de produção industrial de ovos, pela deficiente biossegurança e permanente presença de aves. A coriza infecciosa, embora não seja uma doença de erradicação obrigatória pelos organismos internacionais, raramente ocorre em plantéis de reprodutores industriais, pela qualidade das estratégias de biossegurança (OIE, 2008).

Nas criações não intensificadas de galinhas, as infecções inaparentes por micoplasmas e *Avibacterium* (coriza infecciosa) são comuns, sendo muito recorrentes as doenças clínicas (BLACKALL, 1999; BYARUGABA et al., 2006).

Vários estudos de infecção por MG em granjas comerciais de galinhas e perus determinaram que esta originou-se de criações de subsistência próximas. Na Carolina do Norte, EUA, surtos de MG em galinhas e perus de granjas comerciais foram originários de criações de “fundo de quintal” existente na circunvizinhança (LUTRELL et al., 2001; SCHLUNDT, 2001). Anticorpos contra MG foram detectados em trinta e duas de cinquenta e seis criações de fundo de quintal distantes uma milha de granjas

comerciais (MATSUMOTO et al., 2001). Em galinhas de fundo de quintal destinadas à subsistência familiar, revelou-se a ocorrência de 33% de aves infectadas com MG, indicando risco iminente para criações comerciais próximas (NASCIMENTO, 2000).

Devido à escassez de literatura referente aos quadros de co-infecção ao MDV, considera-se que devido à imunodepressão causada por MDV, patógenos como *M. gallisepticum* e *A. paragallinarum* adquiram vantagem no poder de infecção e invasão do hospedeiro, mais especificamente no sistema respiratório da ave.

Infecções tanto por MDV, quanto por CAV podem causar grandes perdas econômicas em aves de produção, e também impacto em aves de fundo de quintal, em infecções simples ou múltiplas (DAVIDSON; RAIBSHTEIN; AL-TOURI, 2013).

Considerando o vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV), um estudo de ocorrência em galinhas da avicultura familiar em Minas Gerais, indicou um índice de 30% de infecção (BARRIOS et al., 2009).

Entretanto, graves efeitos podem também ser observados em co-infecções por estirpes vacinais de MG e CAV. Um estudo de co-infecção experimental com vacinas de MG (estirpe F) e CAV (estirpe Cuxhaven-1) demonstrou a gravidade do desafio duplo em aves jovens (PREZOTTO et al., 2016), com aumento da mortalidade e das lesões, quando comparado com as infecções isoladas de cada um. CAV, portanto, mesmo com estirpes vacinais, pode representar um importante fator para o aumento da susceptibilidade nestes plantéis.

Surtos simultâneos de infecção de MDV e CAV em frangos de corte com mais de três semanas de idade parece ser um problema grave em muitos países (OTAKI et al, 1987; ZANELLA et al, 2001; MORROW; FEHLER, 2004; DAVIDSON et al, 2004). A patogênese da coinfeção por MDV e CAV ainda é pouco compreendida, embora essa situação tenha sido comprovada em vários estudos experimentais (MILES; REDDY; MORGAN, 2001; HARIDY et al., 2009; HARIDY et al., 2012). Especula-se a relação entre CAV e MDV durante a infecção dupla como sendo simbiótica. Estudos indicam que a forma subclínica de CAV provoca um efeito imunodepressor e conseqüente deficiência na geração de linfócitos T citotóxicos (MARKOWSKI-GRIMSRUD; SCHAT, 2003), o que, por sua vez, acaba facilitando o desenvolvimento de outras doenças (MILLER; SCHAT, 2004). A eventual fraca proteção vacinal induzida pela vacinação contra a MDV, pode resultar as falhas vacinais, e pode decorrer da reativação de CAV. Além disso, as células neoplásicas geradas na doença de Marek são consideradas susceptíveis e hospedeiras de infecção por MDV (ADAIR, 2000; SCHAT; VAN SANTEN, 2013).

A ocorrência (16%) de *Chlamydophila psittaci* (CP) em aves domésticas recebidas na rotina laboratorial foi surpreendente. O aspecto de maior relevância em relação a CP é seu caráter zoonótico. Em se tratando de avicultura familiar, considera-se um potencial risco da transmissão aos integrantes da família em convívio e proximidade com as aves. A infecção por CP em aves domésticas é considerada geralmente de caráter persistente e assintomático, com eliminação intermitente. No entanto, quando as aves são submetidas a fatores estressantes, a manifestação dos sinais clínicos pode ser intensificada, bem como

pode aumentar a taxa de eliminação, potencializando o risco de infecção de outras aves (GERLACH, 1994; HARKINEZHAD, GEENS; VANROMPANY, 2009a) e humanos. Devido à restrição literária referente à infecção concomitante entre MDV e *C. psittaci*, faz-se necessário investigar em estudos de infecção experimental esta relação. Da mesma forma, a coinfeção entre MDV e os outros agentes infecciosos encontrados (*Avibacterium*, *Mycoplasma*) deve ser investigada em estudos de coinfeção experimental.

Visto que, as galinhas provenientes da avicultura familiar não estão enquadradas em padrões sanitários de controle exigidos pelo PNSA, não há estratégias oficiais permanentes para a redução da disseminação de patógenos. Entretanto, a avicultura industrial está sob risco em diversas regiões produtivas pela proximidade da avicultura familiar, exigindo uma ação oficial de vigilância e controle das etiologias de relevância.

### **Caracterização molecular do MDV**

A partir das análises moleculares utilizadas nesse estudo, foi possível caracterizar geneticamente quinze estirpes do vírus da doença de Marek em galinhas em Minas Gerais. Obteve-se a detecção molecular e caracterização genética de parte do gene *Meq*, que codifica a oncoproteína Meq, de estirpes de MDV em Minas Gerais. Quinze estirpes de MDV foram parcialmente sequenciadas no gene *Meq* e comparadas com vinte e três sequências disponíveis no GenBank, sendo duas das estirpes analisadas consideradas de alta virulência.

Por se tratar de dados inéditos no Brasil, não foi possível comparar as informações moleculares geradas neste estudo com outras estirpes circulantes em nosso país. A caracterização molecular de MDV já vem sendo realizada em outros países há vários anos, como Índia, China, Japão, Polônia, Egito, Hungria, Iraque, Austrália, Arábia Saudita e Estados Unidos da América. As informações relativas às estirpes de MDV de referência publicadas no GenBank e utilizados como parâmetros moleculares no estudo do oncogene *Meq* de MDV estão apresentadas à tabela 2. Utilizando o método *neighbor-joining* foi possível gerar a seguinte árvore filogenética para as sequências de *Meq* obtidas e comparadas às publicadas no Genbank (Figura 5).

Tabela 4. Isolados referência de MDV publicadas no GenBank e utilizados como parâmetro molecular no estudo do oncogene *Meq* do vírus da doença de Marek.

Número de acesso no GenBank	Isolado ou estirpe	País	Ano de isolamento
KJ464763.1	9_2000 LORF7	Polônia	2014
HM749324.1	tn-n1	Índia	2010
KM067122.1	KeralaMty-F1	Índia	2014
KC161221.1	Egypt_5	Egito	2013
KP144356.1	ZC2014	China	2014
KJ949617.1	MDV/1/SA/2013	Arábia Saudita	2013
KJ949618.1	MDV/2/SA/2013	Arábia Saudita	2014
KU382456.1	2014055	China	2016
HQ290416.1	GX070092	China	2012
HQ204806.1	31_07_PL	Polônia	2016
AB091109.1	MDCC-RP1	Japão	2003
AY571783.1	RB1B	Hungria	2004
KC243262.1	Iraq3A	Iraque	2013
AY571784.1	ATE	Hungria	2004
AB087744.1	VS-Meq	Japão	2009
AB638846.1	Tocachi-W1	Japão	2012
EF523775.1	Woodlands1	Austrália	2007
AB033119.1	Long Meq	Japão	2002
LC137001.1	MDV-OkiH26070-2014	Japão	2016
HM488350.1	N Meq	Estados Unidos da América	2012
AY362726.1	660-A	Estados Unidos da América	2004
AY362724.1	X Meq	Estados Unidos da América	2004
AY362727.1	686	Estados Unidos da América	2004

Isolados referência disponíveis no GenBank os quais foram utilizados nas árvores filogenéticas obtidas nesse estudo com seus respectivos números de acesso, país de origem e ano.





Figura 5 – Árvore filogenética construída pelo método *neighbor-joining*, para sequência do gene *Meq* de MDV (576 nt) a partir das sequências de nucleotídeos obtidas neste estudo e algumas sequências depositadas no GenBank. Dados submetidos ao teste de confiança em topologia (Bootstrap) com 1000 reamostragens e o método de substituição de nucleotídeos (JTT). Os valores nos entroncamentos indicam os percentuais de *bootstrap* e o número após o país indica o código de acesso da respectiva sequência no Genbank. A distância genética, em substituições por sítio, é indicada pela barra.

Demonstrou-se a formação de quatro grupos genéticos distintos tendo em vista a identidade das sequências de *Meq* entre as estirpes (Figura 5). O agrupamento (clado) que apresentou o maior número de sequências de MDV, reuniu estirpes da Polônia (Acessos N° KJ464763.1/ HQ204806.1), Índia (Acesso N° KM067122.1/ HM749324.1), Japão (Acesso N° AB091109.1/ AB087744.1/ AB638846.1, AB033119.1/ LC137001.1), China (Acesso N° KP144356.1/ KU382456.1/ HQ290416.1), Arábia Saudita (Acesso N° KJ949617.1/ KJ949618.1), Hungria (Acesso N° AY571783.1/ AY571784.1), Egito (Acesso N° KC161221.1), Iraque (Acesso N° KC243262.1), Austrália (Acesso N° EF523775.1) e a maior parte das estirpes analisadas neste estudo, sendo elas, 754b (Acesso N° KY322689), 583 (Acesso N° KY322686), 500 (Acesso N° KY322683), 157 (Acesso N° KY 322682), 172 (Acesso N° KY352468), 573 (Acesso N° KY322684), 590 (Acesso N° KY322687), 755 (Acesso N° KT768121.1), 1042 (Acesso N° KY322692), 136 (Acesso N° KY352470), 184 (Acesso N° KY352469), 578 (Acesso N° KY322685), 607 (Acesso N° KY322688). O segundo clado é composto por estirpes pertencentes aos Estados Unidos da América (Acesso N° HM488350.1/AY362726.1/AY362724.1/AY362727.1) (Tabela 1). O terceiro clado é formado pela estirpe brasileira 155 (Acesso N° KY322681) e o quarto clado é composto pela estirpe brasileira 924-3 (Acesso N° KY322691).

À figura 6 apresenta-se em separado a árvore filogenética formada pelas estirpes referência (GenBank). Pode-se verificar que há a formação de dois grupos distintos filogeneticamente. O primeiro grupo foi formado por estirpes do Japão (Acessos N° AB087744.1/AB033119.1/AB091109.1/AB638846.1), Índia (Acesso N° HM749324.1), Hungria (Acesso N° AY571783.1), Egito (Acesso N° KC161221.1), Austrália (Acesso N° EF523775.1) e Estados Unidos da América (Acessos N° HM488350.1/ AY362726.1/ AY362724.1/ AY362727.1). O segundo grupo foi formado por estirpes do Iraque (Acesso N° KC243662.1), Polônia (Acesso N°: KJ464763.1/HQ204806.1), Índia (Acesso N°: KM067122.1), Arábia Saudita (Acesso N° KJ949617.1/KJ949618.1), Japão (Acesso N°: LC137001.1), China (Acesso N° KU382456.1/HQ290416.1/KP144356.1) e Hungria (Acesso N°: AY571784.1).

A partir da topologia da árvore filogenética à figura 5, obtida da análise dos nucleotídeos e aminoácidos deduzidos das estirpes utilizadas nesse estudo, analisadas juntamente com sequências obtidas no GenBank, para sequências de *Meq*, foi possível inferir que as estirpes 754b, 583, 500, 157, 172, 573, 590, 755, 1042, 136, 184, 578 e 607 apresentam maior similaridade com estirpes do Iraque, China, Polônia, Japão, Índia, Hungria, Austrália e Arábia Saudita. Entretanto, as estirpes 155 e 924-3 apresentaram

características genéticas distintas das estirpes pertencentes ao primeiro grupo, com maior similaridade com estirpes dos Estados Unidos da América.

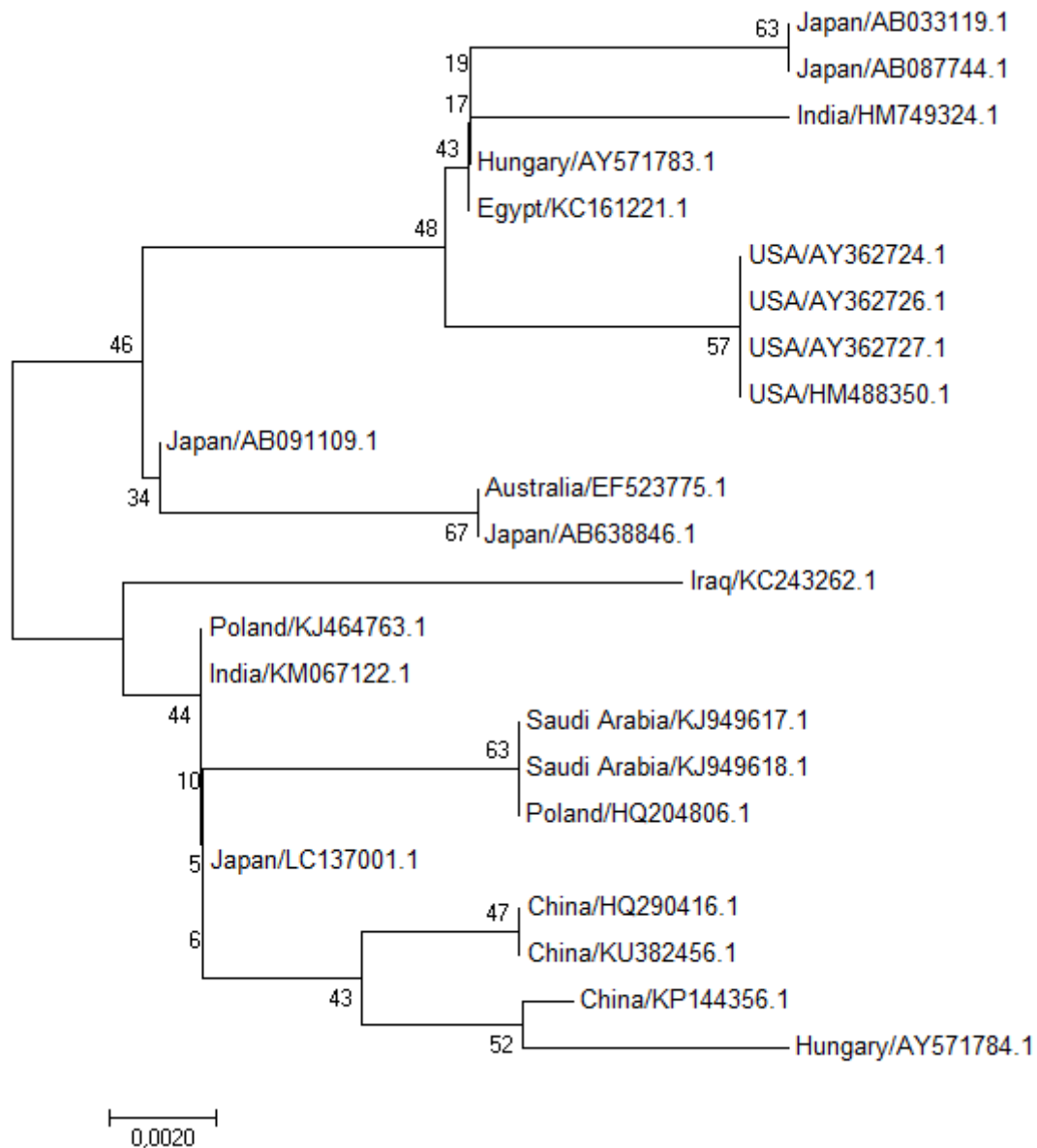


Figura 6 – Árvore filogenética construída pelo método *neighbor-joining*, para sequência do gene *Meq* de MDV (576 nt) a partir das sequências de nucleotídeos depositadas no GenBank. Dados submetidos ao teste de confiança em topologia (Bootstrap) com 1000 reamostragens e o método de substituição de nucleotídeos (JTT). Os valores nos entroncamentos indicam os percentuais de *bootstrap*, sendo que o número após o nome do país indica o código de acesso da respectiva sequência no Genbank. A distância genética, em substituições por sítio, é indicada pela barra.

Para a maior compreensão da topologia da árvore filogenética obtida, assim como da distância genética entre as sequências de nucleotídeos dos isolados analisados nesse estudo, faz-se necessária a caracterização de virulência. Através do sequenciamento foi possível verificar as mutações pontuais que ocorreram no oncogene *Meq* em cada isolado analisado (Tabela 3).

A análise filogenética revelou uma significativa diversidade genética do MDV em Minas Gerais. Foi possível observar que as estirpes 1042 e 924-3 apresentaram as substituições de aminoácidos no oncogene *Meq*, com mudanças compatíveis com estirpes de alta virulência do MDV (vvMDV). Entretanto, as estirpes 155, 157, 500, 573, 578, 583, 590, 607, 754b e 755 foram consideradas como MDV virulentas (vMDV) (Tabela 3). Essa informação vem ao encontro com a topologia da árvore filogenética obtida, onde as estirpes 1042 e 924-3 (vvMDV) apresentaram uma distância genética significativa quando comparadas às demais estirpes caracterizadas diferentemente como vMDV. A estirpe 155 foi caracterizada como vMDV, embora apresente uma distância evolutiva significativa quando comparada às estirpes consideradas virulentas previamente descritas (GenBank). A diferença pode ser justificada pelo fato de que o isolado 155 apresentou mutação somente na posição 176, fazendo com que ele apresente uma distância evolutiva menor quando comparado às estirpes vMDV previamente descritas, os quais apresentaram mais posições com mutações na oncoproteína *Meq*.

Considerando-se a distância genética entre os nucleotídeos das sequências das estirpes analisadas nesse estudo, verificou-se que as estirpes 924-3 e 1042, classificados como de alta virulência (vvMDV), apresentaram uma distância genética significativa, quando comparadas às estirpes de MDV virulentos (vMDV) (GenBank). A estirpe vvMDV 155 apresentou distância genética considerável, quando comparada com os demais isolados considerados MDV virulentos, sendo que essa característica pode ser atribuída ao fato de que esse isolado apresentou somente um ponto de mutação no oncogene *Meq*.

Tabela 5 : Principais pontos de mutação do oncogene *Meq*, seguidos pelos isolados utilizados neste estudo e as respectivas mutações que ocorreram em cada um deles. Assim como os isolados referência utilizados neste estudo e suas respectivas mutações em destaque.

Principais posições de substituição de aminoácidos no Oncogene <i>Meq</i> do MDV																	
Isolados	71	77	80	88	93	112	115	119	139	153	174	176	217	276	283	320	326
1042/Brazil/KY32269 2	<b>A</b>	*	*	<b>A</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	*	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>S</b>	*	<b>P</b>	*	<b>T</b>	<b>E</b>	<b>W</b>	<b>R</b>
155/Brazil/KY322681	*	*	*	*	*	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	<b>Y</b>	*	<b>P</b>	*	<b>T</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>K</b>
157/Brazil/KY322682	*	*	*	*	*	*	*	*	<b>T</b>	<b>S</b>	*	<b>P</b>	*	*	*	<b>C</b>	<b>R</b>
500/Brazil/KY322683	*	*	*	*	*	*	*	*	<b>T</b>	<b>S</b>	*	<b>P</b>	*	*	*	<b>C</b>	<b>R</b>
573/Brazil/KY322684	*	*	*	*	*	*	*	*	<b>T</b>	<b>S</b>	*	<b>P</b>	*	*	*	<b>C</b>	<b>R</b>
578/Brazil/KY322685	*	*	*	*	*	*	*	*	<b>T</b>	<b>S</b>	*	<b>P</b>	*	*	*	<b>C</b>	<b>R</b>
583/Brazil/KY322686	*	*	*	*	*	*	*	*	<b>T</b>	<b>S</b>	*	<b>P</b>	*	*	*	<b>C</b>	<b>R</b>
590/Brazil/KY322687	*	*	*	*	*	*	*	*	<b>T</b>	<b>S</b>	*	<b>P</b>	*	*	*	<b>C</b>	<b>R</b>

607/Brazil/KY322688	*	*	*	*	*	*	*	*	T	S	*	P	*	*	*	C	R
754b/Brazil/KY322688 9	*	*	*	*	*	*	*	*	T	S	*	P	*	*	*	C	R
755/Brazil/KT768121. 1	*	*	*	*	*	*	*	*	T	S	*	P	P	T	*	C	R
924- 3/Brazil/KY322691	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	A	*	A	R	R	N
172/Brazil/KY352468	*	*	*	*	*	*	*	*	T	S	T	A	P	T	R	R	*
136/Brazil/KY352470	*	*	*	*	*	R	*	P	*	S	*	A	P	*	R	R	*
184/Brazil/KY352469	*	*	*	*	*	R	L	P	T	S	T	*	P	T	R	*	*
Poland/KJ464763.1	*	*	*	*	*	*	*	E	S	D	K	E	E	N	S	P	P
India/HM749324.1	*	*	*	*	*	*	*	E	S	D	K	E	E	N	S	*	*
India/KM067122.1	*	*	*	*	*	*	*	E	S	D	K	E	E	N	S	P	P
Egypt/KC161221.1	*	*	*	*	*	*	*	E	S	D	K	E	E	N	S	P	P
China/KP144356.1	*	*	*	*	*	*	*	E	S	D	K	E	E	N	S	P	P
SaudiArabia/KJ94961 7.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	E	N	S	P	P
SaudiArabia/KJ94961 8.1	*	*	*	*	*	*	*	E	S	D	K	E	E	N	S	P	P
China/KU382456.1	*	*	*	*	*	*	*	E	S	D	K	E	E	N	S	P	P
China/HQ290416.1	*	*	*	*	*	*	*	E	S	D	K	E	E	N	S	P	P
Poland/HQ204806.1	*	*	*	*	*	*	*	*	S	D	K	E	E	N	S	P	P
Japan/AB091109.1	*	*	*	*	*	*	*	E	S	D	K	E	E	N	S	P	P
Hungary/AY571783.1	*	*	*	*	*	*	*	E	S	D	K	E	E	N	S	P	P
Iraq/KC243262.1	*	*	*	*	*	*	*	E	S	D	K	E	E	N	S	*	*
Hungary/AY571784.1	*	*	*	*	*	*	*	E	S	D	K	E	E	N	S	P	P
Japan/AB087744.1	*	*	*	*	*	*	*	E	S	D	K	E	E	N	S	P	P
Japan/AB638846.1	*	*	*	*	*	*	*	*	S	D	K	E	E	N	S	P	P
Australia/EF523775.1	*	*	*	*	*	*	*	E	S	D	K	E	E	N	S	P	P
Japan/AB033119.1	*	*	*	*	*	*	*	*	S	D	K	E	E	N	S	P	P
Japan/LC137001.1	*	*	*	*	*	*	*	*	S	D	K	E	E	N	S	P	P
EUA/HM488350.1	*	*	*	*	*	*	*	E	S	D	K	E	E	N	S	P	*
EUA/AY362726.1	*	*	*	*	*	*	*	E	S	D	K	E	E	N	S	P	P
EUA/AY362724.1	*	*	*	*	*	*	*	E	S	D	K	E	E	N	S	P	P
EUA/AY362727.1	F	G	R	*	D	R	E	E	S	D	K	E	E	N	S	P	P

Fonte: Adaptado de Hassanin; Abdallah; El-Araby (2013); Wozniakowski; Samorek-Salamonowicz; Kozdrun (2011); Teng et al.(2011); Zhang et al.(2011). D: Acido Aspártico/ E: Acido Glutâmico/ A: Alanina/ R: Arginina/ N: Asparagina/ F: Fenilalanina/ G:Glicina/ Q: Glutamina/ H: Histidina/ I: Isoleucina/ L: Leucina/ K: Lisina/ M: Metionina/ P: Prolina/ S: Serina/ Y: Tirosina/ T: Treonina/ W: Triptofano/ V: Valina.

Hassanin; Abdallah; El-Araby (2013) observaram que os isolados do Egito apresentaram substituições de aminoácidos deduzidos na proteína Meq nas posições 71, 80, 112, 139 e 176, sendo que, quando se comparam esses mesmos pontos de mutação com os resultados em nosso estudo, foi possível verificar mutações nas mesmas posições. Teng et al. (2011) observaram que os principais pontos de mutações de

aminoácidos na proteína Meq de estirpes de MDV da China ocorreram nas posições 71, 77, 80, 115, 139, 176 e 217, sendo observadas substituições nas posições 139, 176 e 217 em nossos isolados.

O aumento da incidência de MD em galinhas vacinadas foi observado na Argentina no início dos anos 90, sendo que esse fato foi atribuído, principalmente, à má gestão das vacinas e vacinações (BUSCAGLIA; CROSETTI, 1993). No entanto, Buscaglia et al. (1995) associaram esses surtos, pela primeira vez na América Latina, a quatro patótipos variantes muito virulentos de MDV (vvMDV).

Acredita-se que as mutações no sentido da maior virulência do MDV ocorram em função da forte pressão de seleção gerada pela extensa vacinação das aves (WITTER, 1997). Essa pressão evolutiva ocorre em estirpes caracterizadas como sendo de crescente virulência com o decorrer do tempo (DAVISON, VENUGOPAL, 2005; READ et al., 2015). A taxa de mutação de MDV é acelerada pela pressão seletiva, particularmente do sistema imunológico do hospedeiro, tendo em vista que um vírus com estas mutações pode perpetuar-se e tornar-se o grupo populacional dominante (SHAMBLIN et al., 2004; NIIKURA et al., 2006;), tendo em vista que as mutações ocorridas podem representar uma vantagem evolutiva associada à função da proteína Meq (TENG et al., 2011).

As mutações não-sinonímias em MDV podem ocorrer também em função de falhas vacinais, que resultam de indução de proteção incompleta ou insuficiente. Entre as falhas vacinais, inclui-se a aplicação de subdosagem, por diluição da vacina, prática usual na indústria avícola, para a redução de custos. A falha na conservação das vacinas também pode resultar em redução das doses vacinais necessárias à proteção. Falhas também podem ocorrer com a administração incorreta durante a injeção das vacinas (GIMENO et al., 2011).

Entre as quinze sequências do gene *Meq* avaliadas, duas foram consideradas de alta virulência. Levando-se em consideração a informação de que os isolados de alta virulência obtidos nesse estudo (1042 e 924-3) são de galinhas provenientes da avicultura de subsistência, faz-se necessário dimensionar o potencial risco que as galinhas de fundo de quintal representam para a cadeia avícola industrial como um todo, principalmente do ponto de vista sanitário.

A importância da avicultura não industrial como reservatório de patógenos de significado econômico e sanitário tem sido confirmada em diversos estudos. A avicultura de fundo de quintal, tendo em vista potenciais futuros surtos do MDV de alta virulência na avicultura industrial, pode também representar significativo risco sanitário para diversos patógenos, incluindo *Avibacterium* (BLACKALL; SORIANO-VARGAS, 2013), *Mycoplasma* (RAVIV; LEY, 2013) *Pasteurella* (GLISSON; HOFACRE; CHRISTENSEN, 2013), *Salmonella* (GAST, 2013), vírus da laringotraqueíte infecciosa (GARCÍA; KOCK, 2013), vírus da doença de Newcastle (MILLER; KOCK, 2013), entre outros. Surtos de doença foram caracterizados como originários de criações fundo de quintal mantidas nas proximidades das criações industriais na Carolina do Norte, EUA (LUTRELL et al., 2001; SCHLUNDT, 2001), envolvendo *Mycoplasma gallisepticum* em galinhas e perus de granjas comerciais.

Em se tratando das principais posições em que se detectaram substituições de aminoácidos, deve-se levar em consideração que os isolados brasileiros podem apresentar um perfil genético distinto, quando comparados com os isolados do restante do mundo. Não foram encontradas sequências de MDV brasileiras no GenBank, impedindo comparações com as sequências obtidas nesse estudo.

Sendo assim, por se tratar de dados inéditos no Brasil, maiores estudos se fazem necessários visando melhor caracterização de virulência das estirpes locais de MDV, com a possibilidade de estudos de virulência com infecções experimentais. Novas práticas de prevenção mediada por vacinação poderão ser necessárias, incluindo a utilização de vacinas bivalentes ou trivalentes na indústria avícola, tendo em vista a detecção de estirpes de alta virulência do MDV circulantes pelas aves analisadas neste estudo.

## Referências bibliográficas

- ABDUL-CAREEM, M. F.; HUNTER, B. D.; NAGY, É.; READ, L. R.; SANEI, B.; SPENCER, J. L.; SHARIF, S. Development of a real-time PCR assay using SYBR Green chemistry for monitoring Marek's disease virus genome load in feather tips. *Journal of virological methods*, v.133, p.34-40, 2006.
- 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.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; HAFFER, A. A. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v.25, p. 3389-3402, 1997.
- 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.
- BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, gabinete do ministro, instrução normativa nº 56, de 4 de dezembro de 2007.
- 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.

- BLACKALL, P. J.; MATSUMOTO, M. Infectious coryza, p. 691-703. In: SAIF, M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. (Eds.), Diseases of Poultry. 11<sup>th</sup>. ed. Iowa State University Press, Ames, IA, 2003.
- 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.
- 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.
- BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, gabinete do ministro, instrução normativa nº 56, de 4 de dezembro de 2012.
- 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.



- CASTRO, A. G. M. Enfermidades do Sistema Respiratório. In: Berchieri J.A.; Macari M. (Eds). Doenças das Aves. Campinas: Facta, p.71-74, 2000.
- CERDÁ, R. O. Medidas de Prevención y Control de la Micoplasmosis en Latinoamérica. In: Congreso Latinoamericano de Avicultura. Anais. Porto Alegre: Centro de Eventos Fingers, p.111-124, 2007.
- 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.
- CRITTER, R. B. O.; KUIBIDA, K.V.; UHEARA, T. I.; PARRA, P. N. S.; CARVALHO, A. T.. Métodos de Diagnósticos - Microbiológicos, Sorológicos e Anatomopatológicos. In: ANDREATTI, F. R. L. (Ed.). Saúde Aviária e Doenças. São Paulo: Roca, p. 9-17, 2006.
- 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.; RAIBSHTEIN, I.; AL-TOURI, A. Quantitation of Marek's disease and chicken anemia viruses in organs of experimentally infected chickens and commercial chickens by multiplex real-time PCR. Avian Diseases, v.57, p.532-538, 2013.
- DE BLIECK, L. A haemoglobinophilic bacterium as the cause of contagious catarrh of the fowl (*Coryza infectious gallinarum*). Veterinary Journal, v.88, p.9-13, 1932.
- 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.
- DELAPLANE, J. P.; STUART, H. O. The propagation of a virus in embryonated chicken eggs causing a chronic respiratory disease of chickens. American Journal of Veterinary Research, v. 4, p. 325-32, 1943.
- DI FRANCESCO, A.; DONATI, M.; NICOLOSO, S.; ORLANDI, L.; BALDELLI, R.; SALVATORE, D.; SARLI, G.; CEVENINI, R.; MORANDI, F. Chlamydiosis: Seroepidemiologic Survey in a Red Deer (*Cervus elaphus*) Population in Italy. Journal of Wildlife diseases, v. 48, n. 2, p. 488-491, 2012.
- DODD, S. Epizootic pneumo-enteritis of the turkey. Journal Comparative Pathology, v. 18, p. 239-245, 1905.
- 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.
- FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Colibacilose Aviária. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. & MACARI, M. (Eds). Doenças das Aves. Campinas: Facta, p.197-207, 2000.

- FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M.; VARELA, A.P.M.; *Herpesviridae*. Virologia Veterinária, 2ª edição, Editora da UFMS, Santa Maria, p. 503- 570, 2012.
- GAMA, N. M. S. Q.; NASCIMENTO, V. P. Coriza infecciosa das Galinhas e Pasteureloses. In: BERCHIERI, J. A.; MACARI, M. (Eds.). Doenças das Aves. Campinas: Facta, p. 225-237, 2000.
- 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.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95 /98 /NT. *Nucleic Acids Symposium*. n. 41, p. 95-98, 1999.
- 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
- 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.
- 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.
- 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, 2009a.
- 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. T.; TAYLOR, W. R.; THORNTON, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Cabios*, v. 8, p. 275-282, 1992a.
- 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.
- KALETA, E. F.; TADAY, E. M. A. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathology*, v. 32, p. 435-462, 2003.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, v.16, p. 111-120, 1980.

- KLEVEN, S. H. Mycoplasmosis. In: Saif Y.M. (Ed.), Diseases of Poultry. 12th ed. Blackwell, Iowa, p. 805-807, 2008.
- 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.
- LANCASTER, V. T.; FABRICANT, J. The history of Avian Medicine in the United States. IX. Events in the history of Avian Mycoplasmosis, 1905-70. Avian Diseases, v. 32, p. 607-623, 1988.
- LEY, D. H. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: SAIF, Y. M. (Ed.), Diseases of Poultry. 12th ed. Blackwell, Iowa, p. 807-834, 2008.
- LIMA, E. T.; ANDREATTI, F. R. L. Pasteureloses Aviária. In: ANDREATTI FILHO, R. L. (Ed). Saúde Aviária e Doenças. São Paulo: Roca, p.122-126, 2006.
- 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.
- LOCKABY, S. B.; HOERR, F. J. Virulence of *Mycoplasma synoviae* in poultry: a review. Poultry Science, v. 55, p. 175-185, 1999.
- 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.
- 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.
- MENDES, A. A.; NAAS, I. A.; MACARI, M. Produção de frangos de corte. Facta. Campinas, SP, 356 p, 2004.
- 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.
- METTIFOGO, E.; BUIM, M. R. *Mycoplasma gallisepticum*. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. E ORGANIZADORES. Patologia Aviária. Editora Manole LTDA., Barueri-SP, p. 86-100, 2009.
- 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
- NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A.; NASCIMENTO, M. G. F.; BARRETO, M. L. Avian Mycoplasmosis Update. Revista Brasileira de Ciência Avícola, v. 7, n. 1, p. 01-09, 2005.

- NELSON, J.B. Studies on an uncomplicated coryza of the domestic fowl. 1 The isolation of a bacillus which produces a nasal discharge. *Journal of Experimental Medicine*, v.58, p.689-692, 1933.
- 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.
- NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A. Micoplasmoses. In: DI FABIO, J.; ROSSINI, L. I. Doenças das Aves. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 485-496, 2009.
- 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.
- NUNOYA, T., YAGIHASHI, T., TAJIMA, M.; NAGASAWA, Y. Occurrence of keratoconjunctivitis apparently caused by *Mycoplasma gallisepticum* in layer chickens. *Veterinary Pathology*, v.32, p11-18, 1995.
- OIE- Office International des Epizooties. 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.
- PENG, Q. Isolation and characterization of Marek's disease virus (MDV) cDNAs from a MDV-transformed lymphoblastoid cell line: identification of an open reading frame antisense to the MDV Eco-Q protein (Meq). *Virology*, v.221, p.368-374, 1996.
- 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.
- RASO, T. F.; GODOY, S. N.; MILANELO, L.; SOUZA, C. A. I.; MATUSCHIMA, E. R.; ARAÚJO, J. P.; PINTO, A. A. 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.
- RASO, T. F. Clamidiose. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C.; DIAS, J. L. C. *Tratado de Animais Selvagens*. 1. ed. São Paulo: Roca, Cap.47, p. 760-767, 2006.
- RASO, T.F. Clamidiose. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO- DIAS, J. L. (Org.). *Tratado de animais selvagens*. São Paulo: Roca, Cap. 47, p. 760-767, 2007.

- RAZIN, S.; TULLY, J. G. Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology: Molecular Characterization. Academic Press; San Diego, Califórnia. USA, v. 1, p. 215- 265, 1995.
- REIS, S.; NOBREGA, P. Tratado de Doenças das Aves. 2nd: 234. São Paulo: Instituto Biológico, 1955.
- RODOLAKIS, A.; MOHAMAD, K. Y. Zoonotic potential of Chlamydia. Veterinary Microbiology, doi: 10.1016/Jan., v. 140, p. 382-391, 2009.
- ROSENTHAL, A.; COUTELLE, O.; CRAXTON, M. Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. Nucleic Acids Research, v. 21, p. 173-174, 1993.
- 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 *Chlamydia psittaci* strains from culture and clinical samples. *Vet. Microbiol.*, v. 135, p. 22-30, 2009a.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. PNAS.USA, v.74, p. 5463-5467, 1977.
- 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.

- 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, 2001.
- SIQUEIRA, J. L. Diagnóstico Histopatológico. In: ANDREATTI FILHO, R. L. (Ed.). *Saúde Aviária e Doenças*. São Paulo: Roca, p.18-29, 2006.
- SMITH, K. A.; CAMPBELL, C. T.; MURPHY, J.; STOBIEFSKI, M. G.; TENGELSEN, L. A. Compendium of Measures to Control *Chlamydophila psittaci* Infection Among Humans (Psittacosis) and Pet Birds (Avian Chlamydiosis), 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
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, v. 25, p. 4876-4882, 1997.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 Kingdom. 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, 1996.
- VON BU'LOW, 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.; MARCHI, R.; ROSI, P. International 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*, 11<sup>th</sup> ed. Iowa State University Press, Ames, IA, p.407-465, 2003.
- 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.
- 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.
- 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. 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.
- YODER JR, H. W.; DRURY, L. N.; HOPKINS, S. R. Influence of environment on airsacculitis: Effects of relative humidity and air temperature on broilers infected with *Mycoplasma synoviae* and infectious bronchitis. *Avian Diseases*, v. 21, p. 195-208, 1977.
- 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.

## CONCLUSÕES

- Isolados de alta virulência do vírus da Doença de Marek (vvMDV) estão presentes em galinhas de Belo Horizonte e região metropolitana;
- Agentes infecciosos como, *Mycoplasma gallisepticum*, *Avibacterium paragallinarum*, *Chlamydia psittaci* e vírus da anemia infecciosa das galinhas estão agindo em co-infecção com o vírus da doença de Marek em galinhas de Belo Horizonte e região metropolitana;
- O vírus da doença de Marek está em crescente aumento de sua virulência em galinhas de Belo Horizonte e região metropolitana



## ANEXO A



**UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Nelson Rodrigo da Silva Martins,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto Caracterização Molecular de amostras de alta virulência e alta virulência plus do Vírus da Doença de Marek em galinhas em Minas Gerais, submetido a esta comissão pelo protocolo 153 / 2016, a CEUA Decidiu aprovar a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 20/06/2016.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Belo Horizonte, 21/06/2016.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901– Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516– Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea-](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea-) [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)



