



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**DOENÇA DE MAREK EM POEDEIRAS COMERCIAIS VACINADAS: RELATO DE
CASO E ANÁLISE METAGENÔMICA**

ERICH HELFER CARVALHO

Porto Alegre
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**DOENÇA DE MAREK EM POEDEIRAS COMERCIAIS VACINADAS: RELATO DE
CASO E ANÁLISE METAGENÔMICA**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias na área de concentração de Medicina Veterinária Preventiva e Patologia - Virologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Roehle

Porto Alegre
2019

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Carvalho, Erich Helfer
Doença de Marek em poedeiras comerciais vacinadas:
relato de caso e análise metagenômica / Erich Helfer
Carvalho. -- 2019.
97 f.
Orientador: Paulo Michel Roehle.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2019.

1. Avicultura. 2. Doença de Marek. 3. Gallid
alphaherpesvirus 2. 4. Metagenômica. I. Roehle, Paulo
Michel, orient. II. Título.

ERICH HELFER CARVALHO

DOENÇA DE MAREK EM POEDEIRAS COMERCIAIS VACINADAS: RELATO DE CASO E ANÁLISE METAGENÔMICA

Aprovado em 02 de maio de 2019

APROVADO POR:

Dr. Paulo Michel Roehle

Orientador e Presidente da comissão

Dr. Helton Fernandes dos Santos

Membro da comissão

Dr. Thales Furian

Membro da comissão

Dr. Luiz Felipe Caron

Membro da comissão

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a Deus, o Grande Arquiteto do Universo, por abençoar as nossas obras e nos dar sempre Força, Saúde e Sabedoria.

A minha família: esposa Rita Tatiane Leão da Silva e filha Hellen Silva Carvalho pelo amor, carinho, incentivo e apoio em todos os momentos. Aos meus pais Eloi Carvalho e Judite Lurdes Helfer Carvalho, meus irmãos Klaus Helfer Carvalho e Denis Helfer Carvalho pelo apoio em toda a minha educação e trajetória acadêmica.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), a todos os professores e servidores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Em especial ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Michel Roehe, coorientador Prof. Dr. Helton Fernandes dos Santos e amigo Prof. Dr. Fabricio Sousa Campos.

Aos membros da banca avaliadora da tese Prof. Dr. Thales Furian, Prof. Dr. Helton Fernandes dos Santos e Prof. Dr. Luis Felipe Caron pelas considerações e sugestões de melhorias no trabalho.

Em fim, a todos os demais amigos que de uma maneira ou de outra auxiliaram na conquista deste objetivo.

Muito obrigado!

DOENÇA DE MAREK EM POEDEIRAS COMERCIAIS VACINADAS: RELATO DE CASO E ANÁLISE METAGENÔMICA

RESUMO

A doença de Marek (*Marek's disease*, MD), é uma enfermidade oncogênica e imunossupressora, causada pelo *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2), que possui uma significativa importância econômica para a indústria avícola. Os encargos econômicos são por perdas diretas de mortalidade, condenações das carcaças de frangos ao abate, queda na produção de ovos e, bem como, indiretas pelo custo de prevenção da utilização generalizada de vacinas e medidas de controle. Os surtos esporádicos e repetidos nos últimos anos, principalmente em lotes de poedeiras comerciais e matrizes pesadas vacinadas, tem ocorrido em diferentes países e continentes. No Brasil, há poucos relatos e informações a respeito da ocorrência da enfermidade. O diagnóstico da MD e diferencial a outras doenças oncogênicas, envolve os sinais clínicos, lesões macroscópicas, histopatologia e técnicas moleculares. Novas abordagens como a metagenômica têm sido propostas para auxiliar no conhecimento do agente etiológico e suas interações com o microbioma das aves. O sequenciamento de alto desempenho (*high throughput sequencing*; HTS) ou de nova geração (*Next Generation Sequencing*; NGS), com o apoio de ferramentas de bioinformática, tornam possível a utilização da abordagem metagenômica para identificar o microbioma de uma determinada amostra biológica, independentemente de cultivo dos microrganismos. Visando contribuir para o conhecimento da MD no Brasil e a interação do vírus imunossupressor GaHV-2 sobre o microbioma das aves, no presente trabalho foi apresentado um relato de um surto esporádico da MD em poedeiras comerciais e análises metagenômicas de órgãos de poedeiras comerciais saudáveis ou afetadas pela MD. A tese está dividida em três capítulos. O primeiro capítulo apresenta uma revisão bibliográfica sobre a MD. O segundo capítulo, intitulado “Um surto da doença de Marek em poedeiras comerciais vacinadas, no sul do Brasil”, descreve um relato sobre os achados epidemiológicos, clínicos, patológicos e moleculares em um surto esporádico da MD em poedeiras comerciais vacinadas. Os resultados demonstraram que o surto esporádico foi caracterizado como MD tardia em poedeiras comerciais adultas, na epidemiologia pela ocorrência às 38 semanas de idade, e classificado como síndrome neoplásica induzida pelo MDV. A presença de uma cepa patogênica do GaHV-2 foi confirmada e maiores cargas virais encontradas em tecidos com lesões e tumores. A infecção pelo GaHV-2 continua causando, mesmo em aves vacinadas para a MD, sinais clínicos e lesões características, e conseqüentemente, pela mortalidade e queda na produção de ovos, perdas econômicas aos produtores e a indústria de ovos, no sul do Brasil. A ocorrência deste surto esporádico da MD sugere estar associada as falhas de biossegurança e vacinação. Por fim, o terceiro capítulo, intitulado “Análises metagenômicas em poedeiras comerciais saudáveis ou afetadas pela doença de Marek” descreve a utilização do NGS para analisar o microbioma de órgãos de poedeiras comerciais saudáveis e comparar estes achados com os obtidos em aves afetadas pela MD. Os achados deste estudo indicam que poedeiras comerciais afetadas pela MD possuem maior abundância de genomas representativos de famílias virais e bacterianas em órgãos, do que aves saudáveis. A infecção pelo GaHV-2 conduziu a uma modulação do microbioma dos órgãos das aves, favorecendo coinfeções por bactérias patogênicas de interesse em saúde pública.

Palavras-chave: Doença de Marek, *Gallid alphaherpesvirus 2*, metagenômica.

MAREK'S DISEASE IN VACCINATED COMMERCIAL LAYERS: CASE REPORT AND METAGENOMIC ANALYSIS

ABSTRACT

Marek's disease (MD) is an oncogenic and immunosuppressive disease, caused by *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2), which is of significant economic importance to the poultry industry. The economic burden is due to direct losses of mortality, condemnation of chicken carcasses to slaughter, drop in egg production and, as well as, indirect by the cost of preventing the widespread use of vaccines and control measures. The sporadic and repeated outbreaks in recent years, especially in flocks of vaccinated commercial layers and broiler breeders, have occurred in different countries and continents. In Brazil, there are few reports and information regarding the occurrence of the disease. The diagnosis of MD and differential to other oncogenic diseases involves clinical signs, macroscopic lesions, histopathology and molecular techniques. New approaches such as metagenomics have been proposed to assist in the knowledge of the etiological agent and its interactions with the microbiome of birds. High throughput sequencing (HTS) or Next Generation Sequencing (NGS), with the support of bioinformatics tools, make it possible to use the metagenomic approach to identify the microbiome of a given biological sample, regardless of the culture of the microorganisms. Aiming to contribute to the knowledge of DM in Brazil and the interaction of the immunosuppressive virus GaHV-2 on the bird microbiome, in the present study a report of a sporadic outbreak of DM in commercial layers and metagenomic analyses of healthy or MD affected commercial layers organs was presented. The thesis is divided into three chapters. The first chapter presents a literature review on DM. The second chapter, entitled "An outbreak of Marek disease in vaccinated commercial layers in southern Brazil," describes a report on epidemiological, clinical, pathological and molecular findings in a sporadic outbreak of DM in vaccinated commercial layers. The results showed that the sporadic outbreak was characterized as late MD in adult commercial layers, in epidemiology by occurrence at 38 weeks of age, and classified as MDV-induced neoplastic syndrome. The presence of a pathogenic strain of GaHV-2 was confirmed and higher viral loads were found in tissues with lesions and tumors. GaHV-2 infection continues to cause, even in birds vaccinated for MD, clinical signs and characteristic lesions, and consequently, by mortality and decline in egg production, economic losses to producers and the egg industry in southern Barsil. The occurrence of this sporadic outbreak of MD suggests that biosecurity and vaccination failures are associated. Finally, the third chapter, entitled "Metagenomic analysis in commercial layers healthy or affected by Marek disease" describes the use of NGS to analyze the microbiome of healthy commercial layer organs and compare these findings with those obtained in birds affected by MD. The findings of this study indicate that commercial layers affected by DM have greater abundance of genomes representative of viral and bacterial families in organs than healthy birds. GaHV-2 infection led to a modulation of the bird organ microbiome, favoring co-infections by pathogenic bacteria of public health interest.

Keywords: Marek's disease. *Gallid alphaherpesvirus 2*, metagenomic.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Mapa mundial que descreve a distribuição do MDV de casos comprovados apresentados a OIE antes e após 2009..... 10
- Figura 2** - Modelo do MDV e da interação genômica, molecular, celular e do tecido do hospedeiro das aves durante a infecção precoce, patogênese e transformação. 12
- Figura 3** - Modelo da transmissão horizontal e vertical do MDV entre espécies de aves..... 13
- Figura 4** - Evolução da virulência no contexto da vacinação “imperfeita”. 19
- Figura 5** - Linha do tempo da evolução da doença de Marek. 21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição do gênero <i>Mardivirus</i>	8
---------------------------------------------------------------	---

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AnHV-1	<i>Anatid alphaherpesvirus 1</i>
ALV	<i>Avian Leukosis Virus</i> - vírus da Leucose Aviária
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CoHV-1	<i>Columbid alphaherpesvirus 1</i>
Ct	Cycle threshold
DIVA	<i>Differentiation of infected and vaccinated animals</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECP	Efeito citopático
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> - Ensaio imunoenzimático
FEPAGRO	Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
FEG	Fibroblastos de embrião de galinha
GaHV-2	<i>Gallid alphaherpesvirus 2</i>
GaHV-3	<i>Gallid alphaherpesvirus 3</i>
ICBS	Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IHQ	Imunohistoquímica
IPVDF	Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
IR _L / IR _S	<i>Internal repeat long / Internal repeat short</i>
MD	<i>Marek's disease</i> – Doença de Marek
MDV	Vírus da doença de Marek (<i>Marek's disease virus</i>)
MDV- 1	<i>Marek's disease virus 1</i> - Cepa do sorotipo 1 vírus da doença de Marek
MDV- 2	<i>Marek's disease virus 2</i> - Cepa do sorotipo 2 vírus da doença de Marek
MDV- 3	<i>Marek's disease virus 2</i> - Cepa do sorotipo 3 vírus da doença de Marek
MDV-IS	<i>Marek's disease virus to induce immunosuppression</i>
MeHV-1	<i>Meleagrid alphaherpesvirus 1</i>
Meq	<i>Marek's disease EcoR1-Q</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanômetros
ORF	Fase aberta de leitura
OIE	<i>Office International Epizooties</i>
pb / kb	Pares de base / mil pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
q-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
REV	<i>Reticuloendotheliosis virus</i> - vírus da Reticuloendoteliose
RT Nested	<i>Reverse Transcriptase Nested PCR</i>
SRA	<i>Sequence Read Archive</i>
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i> - Livre de patógenos específicos
U _S /U _L	<i>Unique short / Unique long</i>
TR _S /TR _L	<i>Terminal repeat short / Terminal repeat long</i>
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. CAPÍTULO I	6
2.1 Revisão da literatura	6
2.1.1 Doença de Marek – características e história	6
2.1.2 Importância econômica.....	6
2.1.3 Etiologia	7
2.1.3.1 Classificação.....	7
2.1.3.2. Características genômicas	8
2.1.4. Epidemiologia.....	9
2.1.5. Replicação	11
2.1.6. Patogenia	11
2.1.7. Transmissão.....	12
2.1.8. Sinais clínicos e lesões macroscópicas.....	13
2.1.9 Diagnóstico.....	14
2.1.9.1 Sinais Clínicos e lesões macroscópicas	14
2.1.9.2 Histopatologia.....	14
2.1.9.3. Imunohistoquímica	15
2.1.9.4. Isolamento viral	15
2.1.9.5. Detecção de anticorpos	15
2.1.9.6 Técnicas moleculares.....	16
2.1.9.7 Diagnóstico diferencial de neoplasias	17
2.1.9.8 Abordagem metagenômica	17
2.1.10 Prevenção e controle.....	18
2.1.10.1 Vacinas	18
2.1.10.1.1 Vacinas tradicionais.....	18
2.1.10.1.2 Vacinas de novas gerações	20
2.1.11 Evolução do MDV	20
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
4. CAPÍTULO II	24
5. CAPÍTULO III	57
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1. INTRODUÇÃO

A industrialização da produção avícola acompanha a crescente e exigente demanda do mercado consumidor (Kennedy et al., 2018). Estabelece uma situação que conduz a riscos de disseminação e evolução de patógenos, devido as condições de alta concentração de aves nas propriedades e regiões produtoras (Rozins et al., 2019). Um primeiro e clássico exemplo é o vírus da doença de Marek (*Marek's disease virus*, MDV), que é o agente causador da doença de Marek (*Marek's disease*, MD), uma doença de aves que evoluiu de uma síndrome paralítica relativamente inofensiva para uma doença linfoproliferativa e imunossupressora complexa (Witter, 1997), como resultado da industrialização avícola na década de 1960 (Rozins & Day, 2017).

A MD é causada pelo *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2), membro da ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Mardivirus* (ICTV, 2019). Acomete principalmente galinhas (*Gallus gallus*) e menos comumente perus (*Meleagris gallopavo*) e outros *Galliformes* (Baigent et al., 2016). Jozsef Marek, na Hungria, descreveu a doença pela primeira vez em 1907 (Marek, 1907). Possui ocorrência e importância mundial, impondo um encargo econômico substancial à produção de carne de frangos e de ovos (Nair, 2018; Rozins et al., 2019).

No gênero *Mardivirus*, que possui seis espécies, os isolados em aves domésticas possuem diferentes espécies: o GaHV-2 são os únicos patogênicos ou oncogênicos de galinhas (Baigent et al., 2016). O *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3) e o *Meleagrid alphaherpesvirus 1* (MeHV-1) ou herpesvirus de perus (*turkey herpesvirus*, HVT), são naturalmente apatogênicos em aves domésticas (Osterrieder et al., 2006). Além destas, foram descritos outros membros do gênero que infectam aves aquáticas (*Anatid alphaherpesvirus 1*; AnHV-1), pombos (*Columbid alphaherpesvirus 1*; CoHV-1) e pinguins (*Spheniscid alphaherpesvirus 1*; SpAHV1) (Guo et al., 2017; Niemeyer et al., 2017; ICTV, 2019). As cepas do GaHV-2 são classificadas em quatro patotipos, como de baixa (*mild*, m MDV; cepa CU-2), alta (*virulent*, v MDV; cepas HPRS-16, JM), muito alta (*very virulent*, vv MDV; cepas RB-1B, Md5, Md11) e altíssima virulência (*very virulent +*, vv+ MDV; cepas RK-1, 584A, 648A) (Witter et al., 2005).

O diagnóstico da MD e também no diferencial a outras doenças oncogênicas, envolve os sinais clínicos, lesões macroscópicas, histopatologia, imunohistoquímica e técnicas moleculares (Metz et al., 2016). Novas técnicas têm sido propostas para identificar novos

agentes, identificar coinfeções entre diferentes microrganismos e caracterizar a diversidade microbiana, como a abordagem metagenômica, que é um campo de estudos que foi expandido com as tecnologias de sequenciamento de alto desempenho (*high throughput sequencing*; HTS) ou de nova geração (NGS - *Next Generation Sequencing*) e as ferramentas de bioinformática (Lu et al., 2017).

A MD continua a ter uma importância econômica para a indústria avícola, pois surtos repetidos nos últimos anos, principalmente em lotes de poedeiras comerciais e matrizes pesadas vacinadas, tem ocorrido em diferentes países e continentes (Spatz & Silva, 2007; Buscaglia, 2013; Puro et al., 2018). No Brasil, nos períodos de 2013 a 2018, a ocorrência de surtos compatíveis com a MD tem sido evidenciada nas cadeias de produção industrial de aves de postura comercial e matrizes pesadas, no entanto estes relatos, até o momento, não têm sido diagnosticados e ou descritos na literatura.

Baseado na importância da MD para a avicultura e na necessidade de ter mais informações a respeito dos surtos ocorridos, surgiu a necessidade estudar e relatar as infecções causadas pelo MDV. O primeiro capítulo desta tese apresenta uma revisão bibliográfica sobre a doença de Marek. O segundo capítulo relata um caso da MD em poedeiras comerciais vacinadas, demonstrando através dos achados epidemiológicos, clínicos, patológicos e moleculares a presença de uma cepa virulenta de GaHV-2 e, adicionalmente, uma maior quantificação de cargas virais do GaHV-2 nos órgãos das aves afetadas pela MD em comparação as aves saudáveis do mesmo lote. Por fim, o terceiro capítulo apresenta a utilização da abordagem metagenômica, demonstrando os resultados da análise do viroma de órgãos de poedeiras comerciais saudáveis e afetadas pela doença de Marek e, adicionalmente, uma visualização da interação do GaHV-2 presente nos órgãos das aves sobre a diversidade de algumas espécies de bactérias.

2 CAPÍTULO I

2.1 Revisão da literatura

2.1.1 Doença de Marek – características e história

A doença de Marek (*Marek's disease*, MD) é uma doença linfoproliferativa complexa que acomete principalmente galinhas (*Gallus gallus*) e menos comumente perus (*Meleagris gallopavo*), faisões (família *Phasianidae*) e codornas (*Coturnix coturnix*), que inclui uma variedade de síndromes das quais a apresentação de tumores tem um grande impacto econômico para a indústria avícola (Gimeno & Schat, 2018). A doença é causada por um herpesvirus denominado *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2), conhecido como vírus da doença de Marek (*Marek's disease virus*, MDV), que induz tumores, paralisia, severa imunossupressão e morte em aves (Faiz et al., 2016).

Jozsef Marek, médico veterinário da Hungria, descreveu pela primeira vez em 1907 (Marek, 1907) a forma neurológica “clássica” da doença como polineurite. Em 1914, foram relatados surtos nos Estados Unidos e posteriormente a doença foi reconhecida na Holanda, Inglaterra e em muitos outros países. A partir de 1922, nos Estados Unidos, a doença foi relatada por Pappenheimer et al (1926; 1929) com casos mais graves e aves apresentando tumores linfóides em órgãos viscerais, sendo proposta que a polineurite e o linfoma visceral faziam parte da mesma síndrome, a qual denominaram de “neurolymphomatosis gallinarum” (Schat & Nair, 2008). Posteriormente, a partir da década de 1950, a doença foi associada a outras apresentações como a forma aguda com tumores linfóides e severa imunossupressão, sendo nomeada doença de Marek por Biggs (1961) (McPherson & Delany, 2016).

2.1.2 Importância econômica

A MD é uma das principais doenças que afetam a saúde das aves em todo o mundo e o custo total de perdas estimado para a indústria avícola é de 1 a 2 bilhões de dólares anualmente (Nair, 2005).

O MDV é ubíquo, ocorre em praticamente todos os países de produção avícola industrial. Até a década de 1950, a doença clássica possuía uma baixa taxa de mortalidade. Concomitante ao aumento da industrialização avícola na década de 1960, uma forma aguda da doença com tumores linfóides ocasionou uma maior taxa de mortalidade (10-30%), causando uma crise econômica na indústria avícola (Biggs & Nair, 2012). O impacto econômico da MD aguda foi muito alto, pois a morbidade e mortalidade ultrapassavam 60% em lotes de postura

comercial, perdas de 30% em lotes de reprodutoras e frangos de corte e 10% de perdas por condenações de carcaças em frangos de corte. Após a adoção da vacinação na década de 1970, a incidência reduziu e a mortalidade em reprodutoras e poedeiras caiu para 3% a 5% (Schat & Nair, 2008).

A MD continua a ter uma importância econômica na indústria avícola em muitas partes do mundo com alto custo da vacinação e perdas de produtividade, devido à imprevisibilidade dos surtos e falhas das ferramentas de controle pela evolução de cepas mais virulentas do GaHV-2 (Dunn et al., 2017). O custo mundial com vacinação da MD em 2016 foi estimado em 87,5 milhões de euros ou 301 milhões de reais, o que representa 8,10% de todo o mercado de vacinas aviárias no mundo (CEESA, 2016).

2.1.3 Etiologia

2.1.3.1 Classificação

O MDV foi inicialmente classificado como um membro da subfamília *Gammaherpesvirinae*, devido às propriedades biológicas e tropismo por linfócitos, mas foi reclassificado em 2002 como um *Alphaherpesvirus* por sua estrutura molecular e organização do genoma, confirmada pelos estudos de sequenciamento completo do genoma (Lee et al., 2000; Tulman et al., 2000), e classificado no novo gênero *Mardivirus* (Schat & Nair, 2008).

Em 2011, o MDV foi classificado pelo Comitê Internacional para Nomenclatura de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) como membro da ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Mardivirus* (Baigent et al., 2016). Na recente classificação definida em 2019 pelo ICTV, o gênero *Mardivirus* compreende 6 espécies: *Anatid alphaherpesvirus 1* (AnHV-1), *Columbid alphaherpesvirus 1* (CoHV-1), *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2), *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3), *Meleagrid alphaherpesvirus 1* (MeHV-1) e *Spheniscid alphaherpesvirus 1* (SpAHV1) (ICTV, 2019).

No gênero *Mardivirus*, espécies isoladas em aves domésticas que são intimamente relacionadas, têm sido identificadas com base nas características sorológicas e genômicas das cepas virais em três diferentes espécies: O *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2), anteriormente referido MDV-1 (Ex: GA, Md11, Md5) são os únicos patogênicos ou oncogênicos responsáveis pela MD. *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3), anteriormente referido MDV-2 (Ex: SB-1) e *Meleagrid alphaherpesvirus 1* (MeHV-1) ou herpesvírus de perus (*turkey herpesvirus*, HVT), anteriormente referido MDV-3, (Ex: HVT ou FC-126) são

naturalmente não patogênicos em aves domésticas (Osterrieder et al., 2006). Além destas, ainda são descritas as espécies que acometem aves aquáticas (*Anatid alphaherpesvirus 1*; AnHV-1), pombos (*Columbid alphaherpesvirus 1*; CoHV-1) e pinguins (*Spheniscid alphaherpesvirus 1*; SpAHV1) (Guo et al., 2017; Niemeyer et al., 2017; ICTV, 2019).

A espécie GaHV-2 inclui todas as cepas oncogênicas e algumas cepas vacinais naturalmente atenuadas, como a Rispens/CVI988 (Rispens et al; 1972). As cepas oncogênicas de MDV variam significativamente em sua virulência e são classificadas, em quatro patótipos, correspondendo a amostras de baixa (*mild*, m MDV; cepa CU-2), alta (*virulent*, v MDV; cepa HPRS-16), muito alta (*very virulent*; vv MDV; cepa RB-1B ou Md5) e altíssima virulência (*very virulent +*, vv+ MDV; cepa RK-1), utilizando como base de comparação de virulência cepas bem caracterizadas de alta e muito alta virulência JM e Md5, respectivamente, em aves com status de vacinação conhecido (Witter et al., 2005).

Na Tabela 1, é descrito um resumo com as espécies, patótipos, oncogenicidade e principais cepas do gênero *Mardivirus* (Gennart et al., 2015).

Tabela 1 – Descrição do gênero *Mardivirus*.

Espécies	Patótipo	Oncogenicidade	Cepas
GaHV-2	vv+ MDV	+++	RK-1, 584A, 648A
	vv MDV	++	RB-1B, Md5, Md-11
	v MDV	+	GA, HPRS-16, JM
	m MDV	Não	Rispens, CU-2, HPRS17
GaHV-3	m MDV	Não	SB-1, HPRS-24, HN-1
MeHV-1	m MDV	Não	FC-126, WTHV, HPRS-26

GaHV, *Gallid alphaherpesvirus*; MeHV, *Meleagrid herpesvirus*.

2.1.3.2. Características genômicas

A caracterização molecular do genoma completo dos 3 sorotipos de GaHV2 (cepas GA e Md5 do sorotipo 1, cepa HPRS-24 do sorotipo 2 e cepa FC-126 do sorotipo 3) (Tulman et al., 2000; Lee et al., 2000; Afonso et al. 2001; Izumiya et al., 2001; Kingham et al., 2001) confirmou que os genomas são muito semelhantes, constituído de uma fita dupla de DNA linear, com um tamanho de 160 a 180 kb, com 70 a 80 genes, que codificam 103 proteínas (Schat & Nair, 2008).

A estrutura genômica dos 3 sorotipos são típicas de *Alphaherpesvirus* com a divisão em duas regiões: uma sequência longa única (*unique long*, U_L) e uma sequência curta única (*unique short*, U_S). Estas sequências únicas são flanqueadas por conjuntos de sequências de repetição invertidas: repetições terminais longas (*terminal repeat long*, TR_L), repetições internas longas (*internal repeat long*, IR_L), repetições internas curtas (*internal repeat short*, IR_S) e repetições terminais curtas (*terminal repeat short*, TR_S), respectivamente (McPherson & Delany, 2016).

A estrutura do genoma e o conteúdo dos genes de cada região são semelhantes entre todos os sorotipos de GaHV-2, mas existem diferenças-chave em relação aos genes expressados. O sorotipo 1 é definido pela presença do oncogene *meq* (*Marek's disease* EcoR1-Q), que expressa uma fosfoproteína de 339 aminoácidos, a proteína *meq*, e de outros genes que contribuem para as características biológicas únicas, incluindo pp24, pp38, vIL8 e vTR em regiões de repetição, particularmente TR_L. (McPherson & Delany, 2016). Entre todos estes genes, a expressão do gene *meq*, que é abundante em linhas de células T transformadas com GaHV-2 e em tumores, é o de maior possibilidade a estar associado à oncogenicidade e a patogenicidade viral e que pode diferenciar de linfomas induzidos por GaHV-2 de outros agentes causadores de tumores linfóides e também entre vários sorotipos de GaHV-2 (Suresh et al., 2017). No sorotipo 3 do MDV (HVT) foi previamente descrito o gene *sorf1* (Kingham et al., 2001).

2.1.4. Epidemiologia

O hospedeiro natural do MDV são aves da espécie *Gallus gallus* (galinhas), mas perus (*Meleagris gallopavo*), faisões (família *Phasianidae*) e codornas (*Coturnix coturnix*) são susceptíveis à infecção e doença (Gimeno & Pandiri, 2013). A MD está presente nos países produtores de aves de todo o mundo. Provavelmente, todos os lotes de galinhas, criadas em áreas onde a produção avícola é relevante, torna-se infectado e muitos experimentam alguma perda produtiva (Schat & Nair, 2008).

A distribuição da MD é reconhecida mundialmente, embora não seja uma doença de notificação obrigatória de acordo com a Organização Internacional de Epizootias (*Office International Epizooties* - OIE), mas atualmente não existem estimativas precisas de morbidade, perdas econômicas anuais e relatório da distribuição da doença em cada continente (Boodhoo et al., 2016).

O status global da MD é difícil de ser determinado, mesmo que alguns surtos sejam relatados na literatura (Zhuang et al., 2015; Cui et al., 2016) (Dunn & Gimeno, 2013). Morrow & Fehler (2004) descreveram que algumas das principais dificuldades em determinar um status global de MD são: 1- a MD não é uma doença de notificação obrigatória; 2- a ocorrência de MD está muitas vezes ligada às reivindicações financeiras entre empresas produtoras e empresas de genética e ou entre empresas de genética e fabricantes de vacinas sendo que na maioria das vezes estes casos não são tornados públicos; 3 - uma vez que a prevenção da doença requerer uma ótima higiene e gerenciamento, além de várias outras medidas, muitos casos de MD não são relatados para evitar danos à reputação da empresa produtora em causa.

A vigilância global eficaz do MDV requer uma precisão e abrangência de relatórios. Dados atuais da OIE estimam que metade dos países do mundo já relataram casos da MD (Figura 1) (Boodhoo et al., 2016).

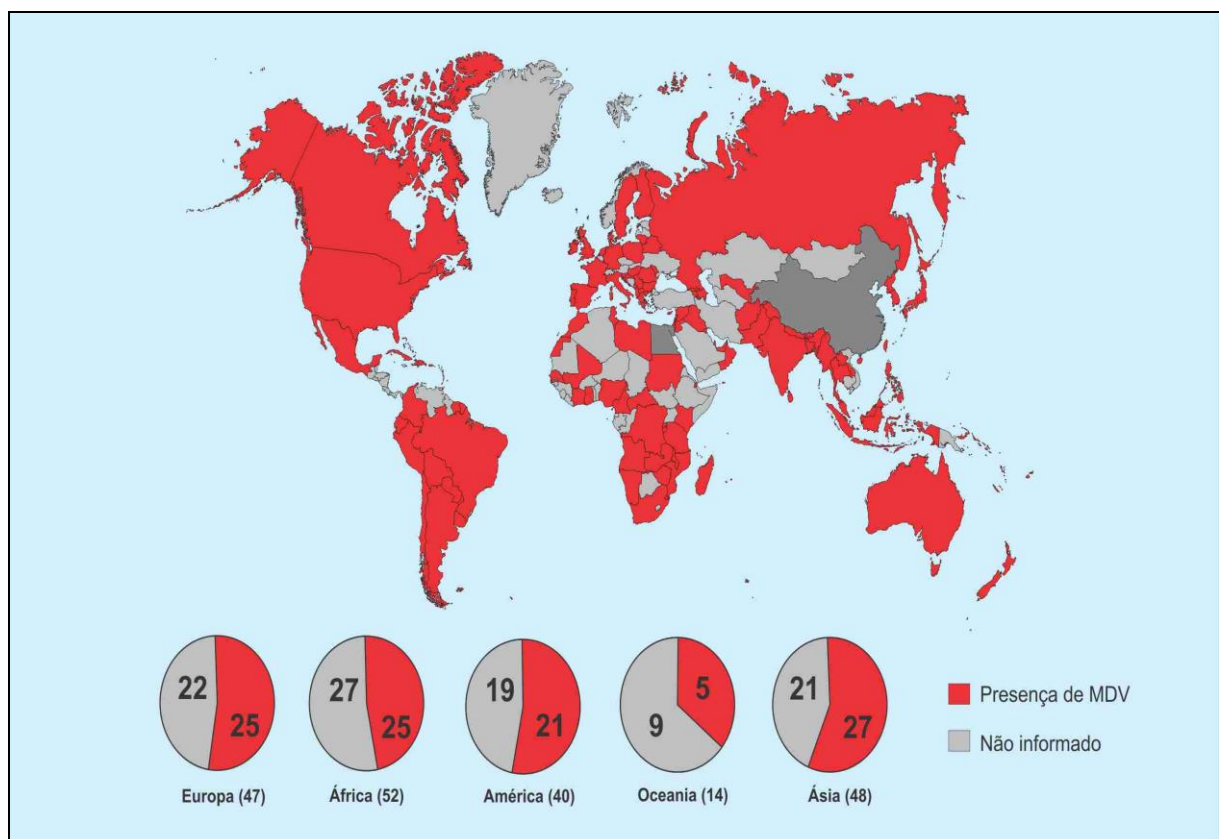


Figura 1. Mapa mundial que descreve a distribuição do MDV de casos comprovados apresentados a OIE antes e após 2009.

FONTE: Adaptado de Boodhoo et al. (2016).

NOTA: A: mapa do mundo descrevendo países com presença do MDV (China e Egito, em preto, são áreas endêmicas para o MDV). B: o gráfico de setores demonstra a localização geográfica dos países que comunicaram casos de MDV a OIE, sendo ausência (azul) e presença da MD (vermelho).

2.1.5. Replicação

A replicação dos três sorotipos do MDV é semelhante a outros herpesvírus. A infecção inicial por vírions envelopados ocorre pela adsorção e penetração nas células susceptíveis. Para a infecção inicial de culturas celulares ou aves pelo vírus, os virions envelopados se ligam aos receptores celulares provavelmente pela glicoproteína gB em combinação com outras glicoproteínas. Nas culturas celulares, a penetração viral ocorre dentro de uma hora após a ligação. A propagação subsequente da infecção para outras células ocorre por contato direto com células infectadas, e a transferência do vírus é provavelmente realizada através da formação de pontes intracelulares, sendo o principal modo de disseminação do vírus *in vitro* e *in vivo* (Schat & Nair, 2008).

2.1.6. Patogenia

A patogenia da MD é muito complexa. As infecções pelo GaHV-2 se dão usualmente através do sistema respiratório, pela inalação dos vírions presentes nas penugens lançadas a partir dos folículos das penas e ou de poeira contaminada com descamações de pele, sendo que a exposição pode ocorrer em aves de 1 dia de idade (Gimeno, 2008). Após a replicação inicial nos pulmões, o vírus replica nos órgãos linfóides, tais como bursa de Fabricius (BF), timo e baço (Nair, 2005).

Existem quatro fases da infecção que contribuem para a persistência viral e patogênese no hospedeiro: a citolítica inicial, a latente, a citolítica tardia e a proliferativa ou de transformação (Adldinger & Calnek, 1973; Osterrieder et al., 2006). Na fase citolítica inicial (2 a 7 dias pós-infecção (dpi)), o vírus é replicado nas células epiteliais do trato respiratório e em seguida nos macrófagos. Através dos macrófagos, é realizada a transição do vírus dos pulmões para os órgãos linfóides, como o baço, timo e bursa de Fabricius (BF), dentro de 24 horas, onde os linfócitos B e T são infectados, com conseqüentemente imunossupressão (McPherson & Delany, 2016). A fase latente (7 a 10 dpi em diante) ocorre principalmente nos linfócitos T CD4+, resultando na disseminação viral, via corrente sanguínea, para os sítios cutâneos de replicação no epitélio folicular das penas, ocorrendo a liberação dos virions no ambiente. Na fase citolítica tardia (14 a 18 dpi em diante) ocorre a reativação das células T CD4+ latentes e imunossupressão. E finalmente, a fase proliferativa (21 a 28 dpi em diante), onde ocorre a transformação das células T CD4+, causando uma proliferação celular descontrolada levando a formação de linfomas de células T CD4+ em órgãos viscerais,

sistema nervoso periférico e central, sistema músculo-esquelético, pele e olhos (Boodhoo et al., 2016)

Um modelo da visão geral da infecção, patogênica e transformação por MDV é proposto, incorporando alguns conhecimentos de dados moleculares, celulares (incluindo citogenética) e genômica (Figura 2).

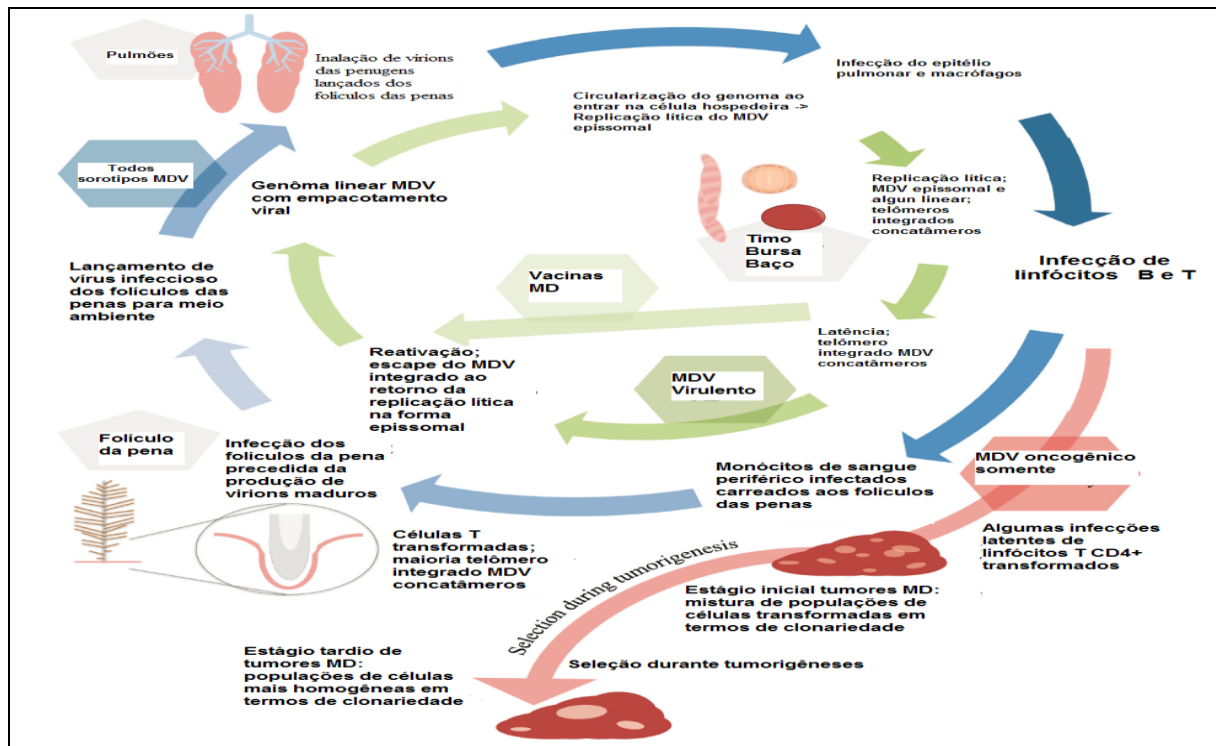


Figura 2. Modelo do MDV e da interação genômica, molecular, celular e do tecido do hospedeiro das aves durante a infecção precoce, patogênica e transformação.

FONTE: Adaptada de Mcpherson & Delany (2016).

NOTA: Três vias interligadas e simplificadas são representadas por setas: verde, status do genoma do MDV-hospedeiro; Azul, movimento do vírus internamente (células e tecidos hospedeiros) e externamente (pena no ambiente); Vermelho claro, transformação e tumorigênica. Ao longo destas rotas, os pentágonos cinza claros com texto e diagramas indicam os órgãos envolvidos na doença e os hexágonos indicam o MDV.

2.1.7. Transmissão

A principal forma de transmissão natural da MD ocorre pelo contato direto ou indireto entre galinhas. As células epiteliais na camada de queratina dos folículos das penas são permissíveis à replicação do vírus. O vírus associado às penas e fezes é a principal fonte de infecção. Não ocorre transmissão vertical e a transmissão pela contaminação externa do ovo é pouco provável, devido à baixa resistência do vírus às condições de temperatura e umidade durante a incubação (Witter & Schat, 2003).

Um modelo para a transmissão horizontal e vertical do MDV entre espécies de aves é descrito na Figura 3.

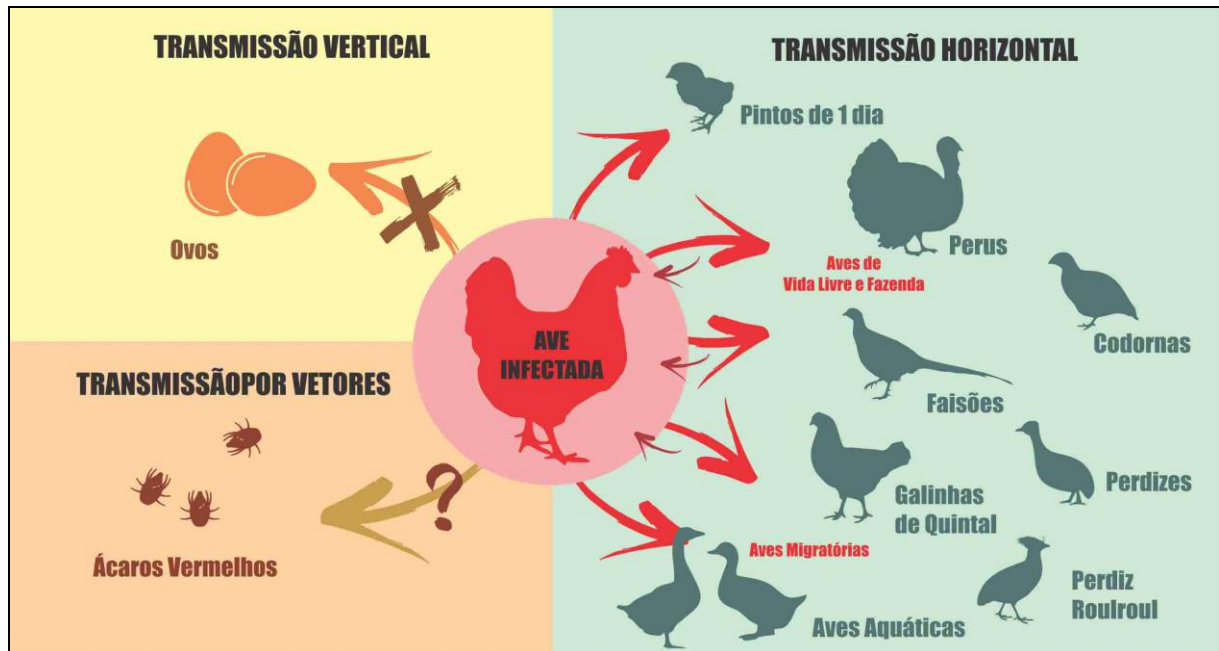


Figura 3. Modelo da transmissão horizontal e vertical do MDV entre espécies de aves.

FONTE: Adaptada de Boodhoo et al. (2016).

NOTA: Os sorotipos de MDV infectam diferentes espécies de aves globalmente. Não ocorre transmissão vertical da galinha para os ovos. Pintos de 1 dia podem ser infectados no ambiente de produção. Várias espécies de aves foram agrupadas: aves de vida livre, aves de fazendas e aves migratórias. Ácaros vermelhos foram identificados como portadores de patógenos de aves, mas o MDV ainda não foi isolado. Aves de vida livre e fazendas são perus, faisão, perdiz e codorna. Aves migratórias como patos e gansos embora infectadas e portadoras, não apresentam papel definido na disseminação de fatores de virulência viral, bem como na capacidade de infectar os sistemas de produção comerciais.

2.1.8. Sinais clínicos e lesões macroscópicas

József Marek (1907) descreveu pela primeira vez a forma neural clássica da doença pela observação de paralisia nas pernas e asas de quatro galos adultos, com baixa morbidade e insignificante mortalidade e considerou ser um processo inflamatório de nervos periféricos, como o nervo ciático, denominando de polineurite. A partir de 1922 Pappenheimer et al. (1926; 1929), nos Estados Unidos, descreveram casos mais graves apresentando mortalidade de até 20% e aves afetadas com polineurite e tumores linfóides em órgãos viscerais.

A doença foi descrita por Witter & Schat (2003) como apresentando duas formas: a clássica e a aguda. A forma clássica, forma neurológica da doença, é caracterizada por polineurite e paralisias totais ou unilaterais das patas, asas, pescoço resultante da infiltração dos linfócitos T transformados nos nervos periféricos (Nair, 2005). A forma aguda, forma de

tumores nos órgãos viscerais, é caracterizada por alta mortalidade, palidez da crista e patas, letargia, cegueira, perda de peso e queda de postura de ovos, possivelmente relacionada com o surgimento de amostras mais virulentas do vírus (Schat & Nair, 2008).

Nos últimos 100 anos, a doença original descrita por Jozef Marek mudou significativamente de severidade e manifestações clínicas, passando de uma síndrome paralítica leve de natureza endêmica para uma doença neoplásica altamente contagiosa com distribuição mundial (Nair, 2005). Atualmente, a MD é caracterizada pelas síndromes induzidas pelo MDV que são divididas em duas categorias: síndromes não neoplásicas, com sinais clínicos neurológicos, oculares, vasculares, e as síndromes neoplásicas, com linfomas nos nervos, pele e vísceras (Gimeno & Pandiri, 2013).

2.1.9 Diagnóstico

Pesquisadores identificaram critérios úteis para auxiliar no diagnóstico da MD e no diferencial a outras neoplasias, envolvendo os sinais clínicos, lesões macroscópicas, histopatologia, imunohistoquímica e técnicas moleculares (Mete et al., 2016). Estes critérios de diagnóstico podem ser utilizados coletivamente para estabelecer o diagnóstico definitivo (Witter et al., 2010). Para análise de múltiplos patógenos e para o entendimento da diversidade microbioma, novas técnicas têm sido propostas, sendo a abordagem metagenômica a mais acurada técnica para este propósito, e além disso, é utilizada para caracterizar a diversidade microbiana, identificar novos agentes e identificar coinfeções entre diferentes microrganismos, possibilitando uma determinação mais precisa da etiologia das doenças (Li et al., 2018).

2.1.9.1 Sinais Clínicos e lesões macroscópicas

O diagnóstico tradicional da MD baseia-se nos sinais clínicos como polineurite e paralisias totais ou unilaterais das patas, asas, pescoço e lesões macroscópicas como os linfomas nos nervos, pele e vísceras (Schat & Nair, 2008).

2.1.9.2 Histopatologia

Na histopatologia são observados infiltrados de células linfoblásticas pleomórficas, diagnóstico diferencial de Leucose linfóide, com células linfoblásticas monomórficas (Canal

& Barbosa, 2009). Na forma inflamatória, pequenos linfócitos e plasmócitos também estão presentes (Schat & Nair, 2008).

2.1.9.3. Imunohistoquímica

A Imunohistoquímica (IHQ) permite a detecção de antígenos virais em tecidos, através da utilização de anticorpo primário específico, conjugação enzimática e anticorpo secundário marcado, com ou sem a utilização de métodos de amplificação (Ramos-Vara, 2005). Anticorpos monoclonais preparados para epítomos dos 3 sorotipos de MDV são utilizados em preferência a anticorpos policlonais para a detecção de antígenos nos tecidos. Os antígenos virais podem ser detectados nas pontas das penas e nos folículos das penas, tecidos linfóides infectados, cérebro ou culturas de células infectadas com anticorpos apropriados (Schat & Nair, 2008).

2.1.9.4. Isolamento viral

A técnica de virologia tradicional para a detecção da infecção por herpesvírus é a cultura de células e o reconhecimento do efeito citopático (Schat & Purchase, 1998). O inóculo pode consistir de linfócitos sanguíneos, sangue total heparinizado, esplenócitos ou células tumorais (Schat & Nair, 2008). Células de rim de galinha e fibroblasto de embrião de pato são as células preferidas para o isolamento do sorotipo 1, enquanto que fibroblasto de embrião de galinha é a preferida para o isolamento dos sorotipos 2 e 3 (Witter & Schat, 2003). As partículas virais estão presentes nos folículos das penas a partir dos 12 dias pós-infecção, e o isolamento viral nas fases mais iniciais da infecção envolve a passagem de células intactas em células de rim de galinha ou de fibroblastos de embrião de galinhas (Franco et al., 2012).

2.1.9.5. Detecção de anticorpos

A detecção de anticorpos específicos no soro tem uma aplicação mais limitada, mas pode ser utilizada no estudo da patogenia e no monitoramento de lotes livres de patógenos específicos (*Specific Pathogen Free*, SPF). Essa detecção pode ser feita por ágar gel imunoprecipitação, imunofluorescência, ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) e vírus neutralização, embora nenhuns dos testes descritos discriminem o sorotipo do MDV (Canal & Barbosa, 2009). As técnicas sorológicas não são

úteis para avaliar a eficácia da vacinação ou para estabelecer a presença de diferentes cepas circulantes (López-Osorio et al., 2017).

2.1.9.6 Técnicas moleculares

A disponibilidade das sequências de nucleotídeos de diferentes genes de um grande número de vírus incluindo o genoma completo dos 3 sorotipos de MDV permite a utilização de métodos moleculares de detecção específica do MDV (Schat & Purchase, 1998).

A reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR) convencional que utiliza primers, desenhados para amplificar as sequências específicas de 132 pb do GaHV-2, tem sido descrita e permite distinguir a cepa vacinal Rispens/CVI988 dos MDVs virulentos pela detecção do DNA viral nos linfomas (Becker et al., 1992; Silva, 1992).

A PCR quantitativa em tempo real (q-PCR) tem tido uma maior aceitação do que a PCR, devido ao aumento da sensibilidade, reprodutibilidade e rapidez, além da redução do risco de contaminação (Baigent et al., 2005). A q-PCR tem sido sugerida como uma ferramenta de diagnóstico definitivo baseada na análise de amostras de tumores onde a carga de MDV é muito maior do que nos tecidos não tumorais (Gimeno, 2008). A q-PCR é um método de diagnóstico molecular sensível e específico que pode ser utilizado para diferenciar e quantificar os sorotipos de MDV (Islam et al., 2004; Baigent et al., 2005; Renz et al., 2006), sendo possível quantificar o número absoluto dos genomas virais por células do hospedeiro de acordo com o sorotipo (Islam et al., 2006). A q-PCR também é utilizada como um método confiável para diferenciação de animais infectados com MDV e vacinados (teste DIVA – *Differentiation of infected and vaccinated animals*) que distinguem e quantificam vacinas do sorotipo 1 (Rispens/CVI988) do vírus de campo (Baigent et al., 2016).

Os métodos de diagnóstico molecular para detecção de vírus ou famílias virais oferecem vantagens em relação às técnicas convencionais de isolamento viral, tais como maior sensibilidade, rapidez e baixo custo. Entretanto, os mesmos são direcionados para identificação de agentes específicos e ou a detecção simultânea de patógenos associados em determinadas síndromes. Porém, as necessidades de conhecimento prévio desses microrganismos limitam a identificação de agentes potencialmente patogênicos e ainda desconhecidos (Blomstrom, 2010). Neste sentido, a abordagem metagenômica têm sido propostas por ser a mais acurada técnica para descrição de comunidades microbianas.

2.1.9.7 Diagnóstico diferencial de neoplasias

Outras doenças neoplásicas economicamente importantes de aves incluem os retrovírus aviários, como o vírus da Leucose Aviária (*Avian Leukosis Virus* - ALV) e o vírus da Reticuloendoteliose (*Reticuloendotheliosis virus* - REV), que induzem lesões patológicas e características histológicas das células tumorais semelhantes a MD (Cao et al., 2013). O REV infecta linfócitos B e T, levando a linfomas de células T e atrofia na bursa de Fabricius em frangos e perus suscetíveis (Fadly et al., 2008). Com base nas propriedades das glicoproteínas do envelope viral, o ALV é classificado em seis subgrupos: A, B, C, D, E e J (Coffin JM, 1992; Fadly & Nair, 2008), dos quais o ALV-E é um vírus endógeno. Os demais ALVs são vírus exógenas que transformam linfócitos B, resultando em linfoma de células B (Ewert & deBoer, 1988).

Um diagnóstico diferencial preciso deve ser realizado, pois os critérios patológicos e histológicos não são sempre adequados devido às diferentes formas de apresentação da MD, e as medidas de controle diferem conforme a etiologia dos linfomas (Gimeno et al., 2005). Desta forma, técnicas de PCR e suas variações, devem ser conduzidas como diagnóstico diferencial de MD, como a detecção de ALV pela transcrição reversa aninhada da PCR (*Reverse Transcriptase Nested PCR* - RT Nested PCR) e ou *Nested-PCR* proposta por Garcia et al. (2003) e a PCR convencional para REV proposta por Aly et al. (1993).

2.1.9.8 Abordagem metagenômica

O advento da análise metagenômica tornou possível caracterizar as comunidades virais e bacterianas sem a necessidade de isolamento, clonagem ou conhecimento prévio dos organismos que possam estar presentes (Willner et al., 2009). O termo metagenômica foi empregado pela primeira vez por Jo Handelsman em 1998, referindo-se à recuperação de genomas de bactérias cultiváveis e não cultiváveis, a partir de amostras de solo (Handelsman et al., 1998). A metagenômica permite a identificação e caracterização genômica de todos os microrganismos presentes em uma amostra e tem sido empregada para investigar a etiologia de doenças nas quais não foram relatados os agentes causadores previamente (Wooley et al., 2010). A metagenômica pode ser aplicada em amostras complexas, com a extração genômica de todos os microrganismos presentes na amostra biológica, seguida pelo sequenciamento e análise dos genomas encontrados (Frey et al., 2014).

A abordagem metagenômica ganhou popularidade com a introdução de métodos de sequenciamento de última geração (*Next-Generation Sequencing* - NGS), que fornecem mais dados em menor tempo e custo e que requerem uma análise de bioinformática apropriada dos conjuntos de dados gerados (Nooij et al., 2018).

2.1.10 Prevenção e controle

A prevenção e o controle de MD são baseados em três critérios: Biossegurança, seleção para resistência genética e vacinação. Embora a genética e a biossegurança sejam essenciais para um controle adequado da MD, a realidade é que o uso de vacinas se tornou o pilar fundamental no controle desta doença (Gimeno & Pandiri, 2013).

2.1.10.1 Vacinas

2.1.10.1.1 Vacinas tradicionais

As vacinas tradicionais contra a MD consistem em vacinas vivas das cepas atenuadas e não oncogênicas de todos os 3 sorotipos de *Mardivirus* (Baigent et al., 2016). As amostras vacinais utilizadas são do sorotipo 2 (GaHV-3, cepa SB1) (Schat & Calnek, 1978) ou sorotipo 3 (MeHV-1, HVT/cepa FC-126) (Okazaki et al., 1970) que são naturalmente não virulentas em galinhas, enquanto a amostra vacinal do sorotipo 1 (GaHV-2, Rispens/CVI988) (Rispens et al., 1972) é naturalmente atenuada (Reddy et al., 2016).

Vacinas contendo a amostra Rispens/CVI988, que são 98% antígenicamente e geneticamente idênticas às estirpes virulentas, normalmente fornecem proteção superior para patótipos vv+ MDV, contra a qual HVT e vacinas bivalentes são ineficazes (Ralapanawe et al., 2016). Por causa disso, atualmente a vacina Rispens/CVI988 é considerada o "padrão ouro" de vacinas para MD e é, portanto, utilizada isoladamente ou combinadas com vacinas preparadas com HVT para proteger as aves que são consideradas mais valiosas: poedeiras de ciclo longo e matrizes (Dunn & Gimeno, 2013). No Brasil, a vacinação contra a MD é obrigatória para todas as galinhas e frangos industriais (BRASIL, 2006).

No entanto, as vacinas tradicionais de MD têm um inconveniente: elas protegem contra o desenvolvimento de tumores, mas não contra a infecção, replicação e transmissão de cepas de campo, de modo que mesmo aves vacinadas podem ser potencialmente infectadas com cepas virulentas de MDV (Faiz et al., 2017). A incapacidade de induzir uma "imunidade esterilizante", na qual há a produção de anticorpos neutralizantes que previnem a infecção, tem desempenhado um papel importante na emergência de novas estirpes de vv+ MDV

capazes de superar a proteção conferida pelas atuais vacinas, afetando sua eficácia (Witter, 1997, Ready et al., 2015). Outros fatores que afetam a eficácia das vacinas de MD são: infecções concomitantes com outros agentes imunossupressores, exposição a amostras de MDVs de campo antes do estabelecimento da imunidade vacinal e a imunização das aves com uma dose de vacina insuficiente para induzir imunidade protetora (Landman & Verschuren, 2003). A vacinação massal de lotes de aves foi uma causa indireta do aumento da patogenicidade das cepas de MDV (Witter, 1997).

Apesar do uso generalizado e bem-sucedido de vacinas tradicionais de MD nos últimos 40 anos, o MDV demonstra uma evolução contínua de virulência (Suresh et al., 2013). As características dos vv+ MDVs emergentes tem causado um grande prejuízo para a indústria avícola e apoia a necessidade de desenvolvimento de novas gerações de vacinas que sejam capazes de proteger não só contra tumores, mas também contra a imunossupressão induzida tardiamente (Reddy et al., 2016). Um modelo para a evolução da virulência no contexto da vacinação “imperfeita” é proposto por Geoghegan & Holmes (2018) (Figura 4).

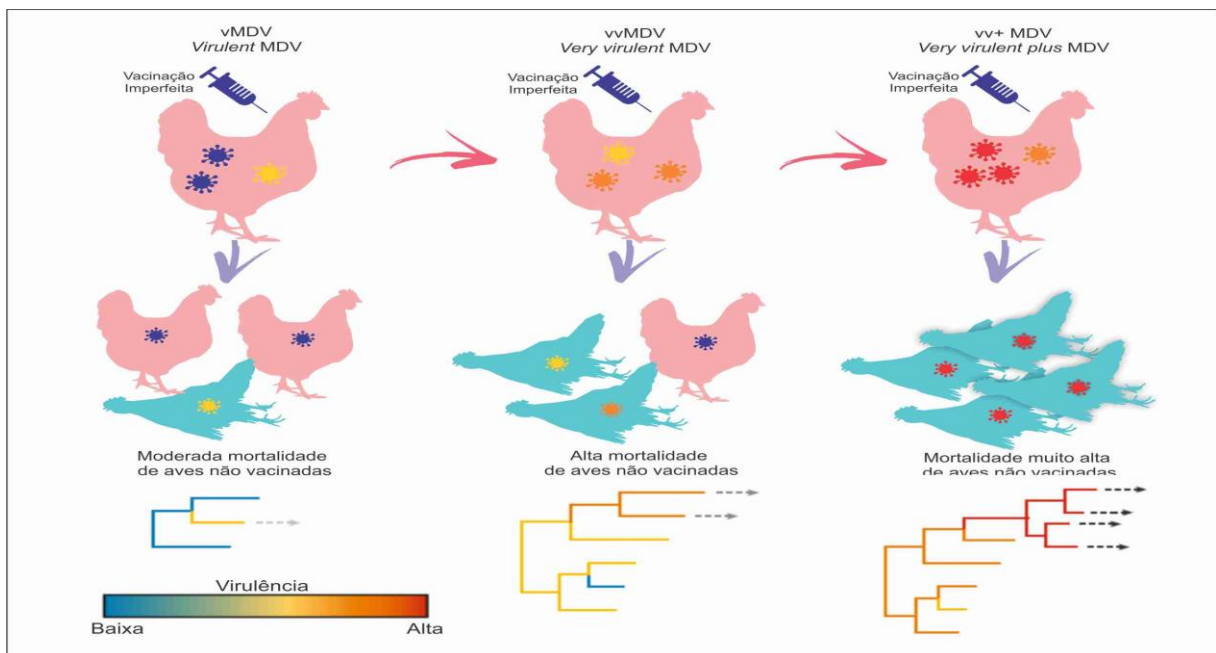


Figura 4. Evolução da virulência no contexto da vacinação “imperfeita”.

FONTE: Adaptada de Geoghegan & Holmes (2018).

NOTA: Na década de 1960, uma vacina foi desenvolvida para o vírus da doença de Marek (MDV) presente em lotes de aves. Esta vacina “imperfeita” reduziu os sintomas da doença, mas não impediu a replicação do vírus, estendendo os períodos infecciosos e, portanto, o potencial de transmissão de cepas virulentas que teriam sido removidas por seleção natural antes da utilização das vacinas. Devido a isso, o vv MDV surgiu dentro de 10 anos, necessitando o desenvolvimento de uma segunda geração de vacinas que também eram imperfeitas. Isto foi seguido, em um período ainda mais curto, pelo aparecimento de um vv+ MDV, exigindo uma vacina de terceira geração. Embora a base genômica da virulência do MDV seja atualmente desconhecida, as filogenias, hipoteticamente atribuem a virulência a múltiplas mutações causais. As setas tracejadas indicam a evolução dos vírus para o próximo grau de virulência.

2.1.10.1.2 Vacinas de novas gerações

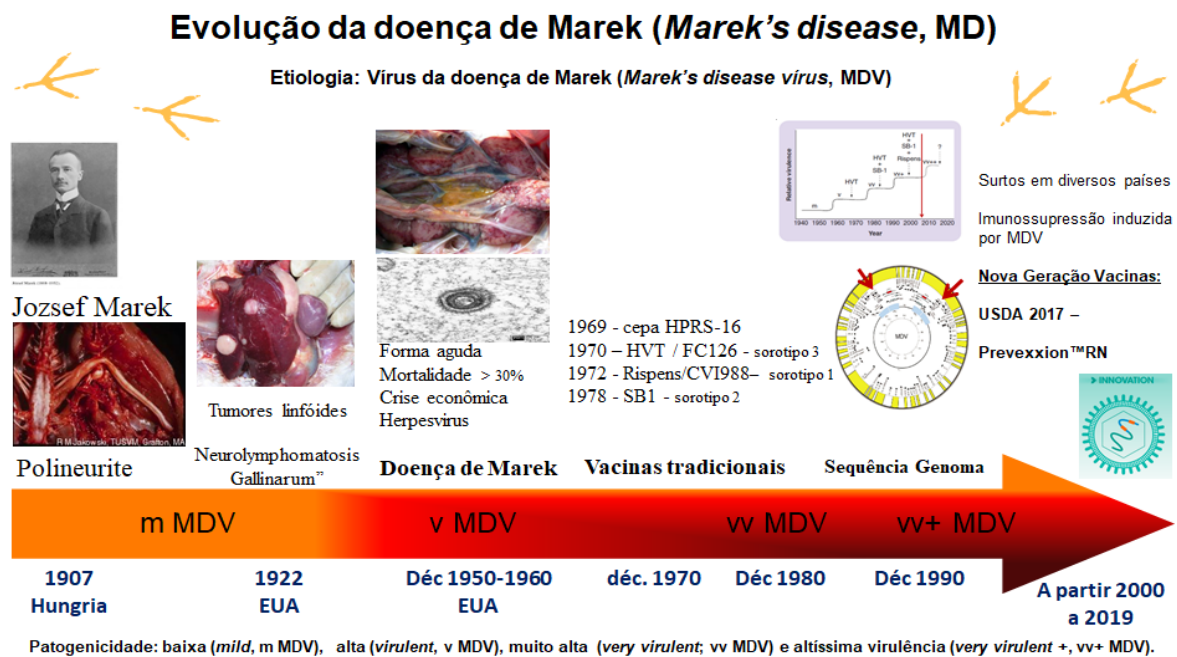
Estratégias para manipular as cepas de GaHV-2 e modificar a sua virulência e propriedades de replicação *in vivo* tem sido utilizada atualmente no desenvolvimento de novas gerações de vacinas de MD com capacidade de controlar as cepas vv+ MDVs emergentes. A estratégia para desenvolver vacinas de nova geração é utilizar o conhecimento dos estudos das funções gênicas (Reddy et al, 2016).

Os avanços recentes na tecnologia do DNA recombinante, com a manipulação dos genomas virais, permitiram a concepção de uma nova vacina recombinante da MD que gerou um vírus recombinante denominado CVRM (recombinação homóloga da cepa CVI988 com a inserção de LTRs do vírus RM1 (B40-RM1Pac = cepa Md5 + cepa RM1) (Lupiani et al., 2013). A CVRM aumentou a replicação *in vitro* comparado com a cepa CVI988, não induziu atrofia de órgãos linfóides e apresentou índices de proteção iguais ou superiores a vacina Rispens/CVI988 (Reddy et al., 2016).

CVRM ou CVRM2 foi patenteada nos Estados Unidos em 2013 pela Merial® (Duluth, GA, US), atual Boehringer Ingelheim® como cepa RN1250 (R= Reddy; N = nitrogênio líquido; 1250: número de série) e licenciada para ser comercializada pelo USDA (*United States Department of Agriculture*) em março de 2017 com o nome comercial Prevexxion™RN. Uma combinação desta vacina do sorotipo 1 (Prevexxion™RN) e uma vacina do sorotipo 3 (HVT) com previsão para ser registrada no USDA em 2018 poderá se tornar um novo “padrão ouro” para programas de vacinação contra a MD (Reddy et al., 2016).

2.1.11 Evolução do MDV

A tese de evolução contínua de isolados de campo de MDV foi proposta inicialmente por Witter (1997) e tem sido comprovado por recentes relatos de surtos, principalmente em lotes de poedeiras comerciais e matrizes pesadas vacinadas com HVT ou Rispens/CVI988 ou vacinação bivalente (HVT+ Rispens/CVI988) (Suresh et al., 2017). Nos últimos 15 anos, as cepas vv+ MDV foi o patótipo predominante isolado em todo o mundo a partir de aves vacinadas para MD (Zhang et al., 2011), para as quais as vacinas tradicionais da MD não parecem gerar uma proteção muito robusta (Gimeno, 2008). Uma linha do tempo da evolução da MD esta descrita na Figura 5.



Ordem: *Herpesvirales*. Família: *Herpesviridae*. Subfamília: *Alphaherpesvirinae*. Gênero: *Mardivirus* (com 5 espécies).

- Sorotipo 1: *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2) – patogênicos/oncogênicos responsáveis pela MD.
- Sorotipo 2: *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3) - não patogênicos.
- Sorotipo 3: *Meleagrid alphaherpesvirus 1* (MeHV-1) ou herpesvirus de perus (*turkey herpesvirus, HVT*) - não patogênicos.

Figura 5. Linha do tempo da evolução da doença de Marek.

FONTE: Elaborada pelo autor.

NOTA: Desde o primeiro relato da doença em 1907, por Jozsef Marek na Hungria, até a uma série de surtos e do desenvolvimento de vacinas na segunda metade do século XX e início do século XXI.

A patogênese dos recentemente emergentes vv+ MDVs estão associados não apenas a um aumento da oncogenicidade, mas também a uma infecção citolítica aguda mais grave, paralisia transitória e imunossupressão (Gimeno & Pandiri, 2013), um complexo fenômeno denominado imunossupressão induzida por MDV (*Marek's disease virus to induce immunosuppression* – MDV-IS) que é dividida em MDV-IS precoce (*early MDV-IS*) e MDV-IS tardia (*late MDV-IS*) (Faiz et al., 2017). A exposição precoce de estirpes vv+ MDVs em frangos de corte vacinados para MD causa uma imunossupressão manifestada como uma resposta imunológica insatisfatória a outras vacinas administradas mais tarde na vida das aves e mostrou que a imunossupressão pode ocorrer na ausência de atrofia de órgãos linfóides ou tumores (Faiz et al., 2016).

A tendência evolutiva do MDV para uma maior virulência com surtos repetidos nos últimos anos tem sido uma grande preocupação para a indústria avícola mundial, principalmente na África Ocidental, Europa Oriental, Ásia Oriental e América do Sul, pois esta comprometendo a proteção conferida pelas vacinas atualmente disponíveis (Dunn & Gimeno, 2013). Estudos recentes demonstraram que em regiões onde as cepas de vv+ MDVs

foram isolados no final dos anos 90, vv+ MDVs ainda permanecem prevalentes na área quando ocorrem surtos de MD (Dunn et al., 2016).

Os surtos de MD em lotes de aves vacinadas onde foram isolados os patótipos vv MDVs e vv+ MDVs têm ocorrido em mais de 14 países de diferentes continentes no período de 1990 a 2017: Na América: Colômbia (López-Osorio et al. 2017), Argentina (Buscaglia et al., 2004; Buscaglia, 2013) e Estados Unidos (Witter, 1997; Reddy et al., 2002; Spatz & Silva, 2007). Na Europa: Hungria e Polônia (Wóznikowski et al., 2010; Wóznikowski et al., 2011). Na Ásia: China (Zhang & Cui, 2005; Zhang et al., 2011; Teng et al., 2011; Yu et al., 2013; Gong et al., 2013; Zhuang et al., 2015; Cui et al., 2016), Taiwan (Lin e Chen, 1996), Arábia Saudita (Mohamed et al., 2016), Iraque (Wajid et al., 2013) e Índia (Raja et al., 2009; Tian et al., 2011; Arulmozhi et al., 2012; Gopal et al., 2012; Suresch et al., 2013; Suresch et al., 2015, Suresch et al., 2017). Na África: Egito (Hassanin et al., 2013), Etiópia (Lobago et al., 2004) e Nigéria (Okonkwo, 2015). Na Oceania: Austrália (Renz et al., 2012).

No Brasil, a MD tem sido evidenciada principalmente, nos sistemas de produção de matrizes pesadas e poedeiras comerciais. A doença tem sido amplamente estudada por pesquisadores no mundo todo, no entanto, os relatos dos surtos e as pesquisas das principais causas apresentam-se escassas no Brasil (Back, 2004; Torres et al., 2019).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Contribuir para o aumento do conhecimento sobre as infecções causadas pelo vírus da doença de Marek (GaHV-2).

3.2. Objetivos específicos

1. Relatar a ocorrência da doença de Marek em poedeiras comerciais vacinadas.
2. Avaliar os aspectos epidemiológicos, clínicos, patológicos e moleculares durante a ocorrência de um surto em poedeiras comerciais vacinadas.
3. Realizar uma análise metagenômica do microbioma de órgãos de poedeiras comerciais saudáveis e afetadas pela MD.

4. CAPÍTULO II

Um surto da doença de Marek em poedeiras comerciais vacinadas, no sul do Brasil

Erich Helfer Carvalho, Helton Fernandes dos Santos, Nilo Ikuta, André Salvador Kazantzi Fonseca, Flávio Silva, Paulo Michel Roehle.

Este capítulo será apresentado sob a forma de artigo científico a ser submetido ao periódico *Brazilian Journal of Poultry Science*.

Um surto da doença de Marek em poedeiras comerciais vacinadas, no sul do Brasil

Erich Helfer Carvalho^{*1}, Helton Fernandes dos Santos², Nilo Ikuta^{3,4}, André Salvador Kazantzi Fonseca⁴, Flávio Silva⁵, Paulo Michel Roehle¹

¹Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias (LCDPA), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

³Laboratório de Diagnóstico Molecular, Universidade Luterana do Brasil – ULBRA, Canoas, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁴Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁵Médico Veterinário, responsável técnico da empresa Naturovos, Salvador do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

Um surto da doença de Marek em poedeiras comerciais vacinadas, no sul do Brasil

RESUMO

A doença de Marek (MD) é uma enfermidade linfoproliferativa, causada pelo vírus da doença de Marek (MDV), formalmente *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2). O controle da MD é baseado em seleção de animais geneticamente resistentes, medidas de biossegurança e vacinação. No Brasil, surtos da MD têm ocorrido em poedeiras comerciais e matrizes pesadas vacinadas. O presente estudo relata os achados epidemiológicos, clínicos, patológicos e moleculares em um surto esporádico de MD em poedeiras comerciais vacinadas com as cepas Rispens/CVI988 e HVT/FC-126, ocorrido em uma granja no sul do Brasil. Em um lote de 22.323 poedeiras, com 38 semanas de idade, 35 aves apresentaram sinais de comprometimento neurológico, mortalidade e queda na produção de ovos. Uma primeira detecção do genoma de GaHV-2 e Rispens/CVI988 foi realizada por PCR e, posteriormente, uma qPCR para amplificação do GaHV-2 e HVT/FC-126. Foram observadas uma prevalência de 1,72%, mortalidade de 0,33%/semana e acumulada de 9%, redução na produção de ovos de 2,24%/semana e 0,44% do total. Os sinais clínicos neurológicos foram a paralisia unilateral e completa das patas, com a consequente dificuldade locomotora, e outros, como depressão, letargia e diarreia. As lesões macroscópicas foram o espessamento no nervo ciático e tumores nodulares e difusos nos órgãos, e os achados histopatológicos incluíram os linfócitos pleomórficos entre as fibras nervosas do nervo ciático e em órgãos. Foi amplificado um fragmento (566 pb) do genoma de uma cepa virulenta de GaHV-2 em 4 de 10 *pools* de órgãos (fígado, baço, ovário, rins e pele) (40%), e negativo para a cepa vacinal Rispens/CVI988. À qPCR, HVT/FC126 foi detectada em 6 de 10 *pools* de órgãos (60%), sendo 2 *pools* nas aves afetadas pela MD e 4 *pools* nas aves saudáveis. Os genomas de GaHV-2 foram detectados em maior número (18/19; 94,74%) e com cargas virais mais altas ($10^{6,19}$ cópias) nas aves afetadas pela MD, do que nas aves saudáveis (1/16; 6,25%; $10^{0,8}$ cópias). O surto esporádico foi caracterizado como MD tardia em poedeiras comerciais adultas, na epidemiologia pela ocorrência às 38 semanas de idade, e classificado como síndrome neoplásica induzida pelo MDV. A PCR e qPCR revelou que o GaHV-2 patogênico está circulante, e impõe perdas econômicas aos produtores e à indústria de ovos, no sul do Brasil, sendo que a ocorrência da MD sugere estar associada às falhas de biossegurança e vacinação.

Palavras-chave: *Gallid herpesvirus 2*, saúde das aves, vacinação.

A sporadic outbreak of Marek's disease in vaccinated commercial layers in southern Brazil.

ABSTRACT

Marek's disease (MD) is a lymphoproliferative disease, caused by Marek's disease virus (MDV), formally *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2). MD control is based on selection of genetically resistant animals, biosecurity measures and vaccination. In Brazil, outbreaks of MD have occurred in vaccinated commercial layers and broiler breeders. The present study reports epidemiological, clinical, pathological and molecular findings in a sporadic outbreak of MD in commercial layers vaccinated with Rispens/CVI988 and HVT/FC-126 strains, which occurred on a farm in southern Brazil. In a flock of 22,323 layers, at 38 weeks of age, 35 birds showed signs of neurological impairment, mortality and decreased egg production. A first detection of the GaHV-2 and Rispens/CVI988 genomes was performed by PCR and subsequently a qPCR for amplification of GaHV-2 and HVT/FC-126. A prevalence of 1.72%, mortality of 0.33%/week and accumulated mortality of 9%, reduction in egg production of 2.24%/week and 0.44% of the total were observed. The neurological clinical signs were unilateral and complete paralysis of the legs, with consequent locomotor difficulty, and others, such as depression, lethargy and diarrhea. The macroscopic lesions were enlargement of the sciatic nerve and nodular and diffuse tumors in the organs and histopathological findings included pleomorphic lymphocytes between the nerve fibers of the sciatic nerve and in organs. A fragment (566 bp) of the genome of a virulent GaHV-2 strain was amplified in 4 of 10 organ pools (liver, spleen, ovary, kidneys and skin) (40%), and negative for the Rispens/CVI988 vaccine strain. At qPCR, HVT/FC126 was detected in 6 of 10 organ pools (60%), with 2 pools in birds affected by MD and 4 in healthy birds. GaHV-2 genomes were detected in higher numbers (18/19; 94.74%) and with higher viral loads ($10^{6.19}$ copies) in MD affected birds than in healthy birds (1/16; 6.25%; $10^{0.8}$ copies). The sporadic outbreak was characterized as late MD in adult commercial layers, in epidemiology by occurrence at 38 weeks of age, and classified as MDV-induced neoplastic syndrome. PCR and qPCR revealed that pathogenic GaHV-2 is circulating, and imposes economic losses on producers and the egg industry in southern Brazil, and the occurrence of MD suggests being associated with biosecurity and vaccination failures.

Keywords: Marek's disease, biosecurity, *Gallid alphaherpesvirus 2*, vaccination.

INTRODUÇÃO

A doença de Marek (*Marek's disease*, MD) é uma enfermidade linfoproliferativa que acomete principalmente galinhas (*Gallus gallus*) e menos comumente perus (*Meleagris gallopavo*) e outros *Galliformes*, sendo uma das principais doenças que afetam aves em todo o mundo e que impõe perdas na produção de carne de frangos e ovos, estimadas em 1 a 2 bilhões de dólares anualmente (Morrow & Fehler, 2004; Nair, 2018). Jozsef Marek, na Hungria, descreveu a doença pela primeira vez em 1907 (Marek, 1907), tendo na ocasião descrito a forma neurológica clássica, caracterizada por uma polineurite. No entanto, o vírus somente viria a ser isolado pela primeira vez em 1968 (Churchill, 1968). A doença é causada pelo *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2), conhecido como vírus da doença de Marek (*Marek's disease virus*, MDV), membro da ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Mardivirus* (Baigent et al., 2016; ICTV, 2019). O GaHV-2, além de induzir imunossupressão, induz síndromes como as síndromes não neoplásicas e as síndromes neoplásicas (Gimeno & Pandiri, 2013).

Os estudos indicam que o vírus é ubíquo (Dunn & Gimeno, 2013; Mete et al., 2016; Nair, 2018), entretanto, dados de vigilância epidemiológica demonstram que o vírus não está presente em todas as granjas de produção comercial (Groves et al., 2008, Kennedy et al., 2017; Kennedy et al., 2018). O *status* da prevalência global da MD e estimativas das perdas econômicas anuais são difíceis de serem determinados (Dunn & Gimeno, 2013, Kennedy et al., 2018), por ser uma enfermidade em que a notificação não é compulsória (Boodhoo et al., 2016; OIE, 2017).

O gênero *Mardivirus* inclui seis espécies, destas, três foram isoladas em aves domésticas e classificadas com base em suas características genômicas: o *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2), o *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3) e o *Meleagrid alphaherpesvirus 1* (MeHV-1) ou herpesvírus de perus (*turkey herpesvirus*; HVT), além destas, ainda são descritas as espécies que acometem aves aquáticas (*Anatid alphaherpesvirus 1*; AnHV-1), pombos (*Columbid alphaherpesvirus 1*; CoHV-1) e pinguins (*Spheniscid alphaherpesvirus 1*; SpAHV1) (Guo et al., 2017; Niemeyer et al., 2017; ICTV, 2019). A espécie GaHV-2 é a única patogênica ou oncogênica que acomete galinhas (Baigent et al., 2016). As cepas de GaHV-2 são classificadas em quatro patotipos, de acordo com seu potencial de indução de sinais clínicos neurológicos, lesões linfoproliferativas e linfomas (Witter et al., 2005): amostras de baixa (*mild*, m MDV; cepa CU-2), alta (*virulent*, v MDV; cepas HPRS-16, JM, GA), muito alta (*very virulent*; vv MDV; cepas RB-1B, Md5, Md11) e

altíssima virulência (*very virulent* +, vv+ MDV; cepas RK-1, 584A, 648A) (Witter et al., 2005).

A patogenia da MD é reconhecida em quatro fases da infecção, que contribuem para a persistência viral e patogênese no hospedeiro: a citolítica inicial ou primária (2-7 dias pós-infecção (dpi)), a latente (7 a 10 dpi em diante), a citolítica tardia ou secundária (14 a 18 dpi em diante) e a proliferativa ou de transformação (21 a 28 dpi em diante) (Addinger & Calnek, 1973; Calnek, 2001; McPherson & Delany, 2016). As células descamadas do epitélio dos folículos das penas, que se combinam com as penas, fezes, substrato da cama e a poeira ambiental, são as principais fontes de infecção, persistindo nos intervalos entre diferentes lotes (Rozins & Day, 2017) e em períodos entre 20 a 425 dias (Kennedy et al., 2018). A principal forma de transmissão é a horizontal (Boodhoo et al., 2016).

Os critérios para auxiliar no diagnóstico da MD e no diferencial a outras neoplasias, envolvem a epidemiologia como a idade das aves, os sinais clínicos neurológicos, as lesões macroscópicas nos nervos periféricos, a histopatologia, o isolamento viral, a imunohistoquímica e as técnicas moleculares (Mete et al., 2016). No diagnóstico diferencial a MD, outras doenças neoplásicas devem ser consideradas, como as causadas pelo vírus da Leucose Aviária (*Avian Leukosis Virus*; ALV) e pelo vírus da Reticuloendoteliose (*Reticuloendotheliosis virus*; REV) (Gimeno & Pandiri, 2013).

O diagnóstico molecular é atualmente o método de eleição para o diagnóstico definitivo da MD, realizado através da reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*; PCR) e/ou da PCR quantitativa em tempo real (*quantitative real-time PCR*; qPCR) (Gimeno et al., 2005; Gimeno, et.al, 2013). A PCR baseada na sequência repetitiva de nucleotídeos de 132 pb, permite diferenciar o GaHV-2 das espécies não oncogênicas GaHV-3 e MeHV-1, bem como, das cepas atenuadas de campo e vacinal Rispens/CVI988 (Becker et al., 1992; Silva, 1992). A qPCR foi apresentada como uma nova abordagem no diagnóstico da MD, devido ao aumento na sensibilidade, reprodutibilidade e rapidez (Islam et al., 2004; Gimeno et al., 2005; Baigent et al., 2005; Baigent et al., 2016).

A prevenção e controle da MD é baseada em três critérios: biossegurança, seleção para resistência genética e vacinação (Gimeno & Pandiri, 2013). A vacinação foi introduzida no início dos anos 70 (Churchill et al., 1969; Okazaki et al, 1970; Nair, 2018). As vacinas contêm o vírus viável, replicativas, e consistem nas cepas das espécies MeHV-1 ou HVT (cepa HVT/FC-126) (Witter et al., 1987; Okazaki et al, 1970) e do GaHV-3 (cepa SB1) (Schat & Calnek, 1978) que são naturalmente apatogênicas em galinhas, enquanto a cepa do GaHV-2 (cepa Rispens/CVI988) (Rispens et al, 1972) é naturalmente atenuada (Reddy et al, 2016). A

vacinação foi iniciada com a cepa HVT/FC-126 (ano de 1970), seguida, por HVT/FC-126 e SB-1 (a partir 1980) e Rispens/CVI988 (década de 1990), usada sozinha e ou combinada, que se tornou o “padrão-ouro” da vacina no mundo pela eficácia no controle das cepas mais virulentas (vv e vv+ MDV) (Gimeno, 2008, Dunn & Gimeno, 2013).

No Brasil, a vacinação contra a MD é obrigatória para todas as galinhas e frangos industriais (BRASIL, 2006). As empresas têm implementando um programa de vacinação intensivo nos incubatórios contra a MD, onde a vacinação é realizada em aves de 1 dia de idade via subcutânea ou com 18 a 19 dias de incubação via *in ovo*. No sistema de produção de frangos de corte é utilizada a cepa HVT/FC-126 e nos sistemas de produção de aves de ciclo longo (avós, matrizes leves e pesadas, poedeiras comerciais) utiliza-se a combinação das cepas Rispens/CVI988 e HVT/FC-126 (Canal & Barbosa, 2009). Mesmo assim, lotes ainda sucumbem à infecção e há a ocorrência de surtos esporádicos em aves de vida livre (Abreu et al., 2016) e nas cadeias de produção industrial de poedeiras comerciais e matrizes pesadas (Back, 2004; Sousa, 2010), sendo que as possíveis causas destes surtos, que influenciam na eficácia das vacinas, estão relacionadas às falhas nas medidas de biossegurança (Schatt & Nair, 2008), vacinação (Gimeno et al., 2011) e na evolução das cepas de MDV superando a imunidade das vacinas combinadas Rispens CVI/988 e HVT/FC-126 (Witter, 2011; Gimeno & Schatt, 2018, Puro et. al., 2018). Entretanto, no Brasil, há escassas publicações referentes ao diagnóstico, frequências dos casos e à detecção das cepas de campo envolvidas nos surtos (Torres et al., 2019). Baseado nestes fatos, o objetivo desse estudo é relatar os achados epidemiológicos, clínicos, patológicos e moleculares em um surto esporádico da MD em um lote de poedeiras comerciais vacinadas, no sul do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Histórico epidemiológico e clínico

Em setembro de 2015 ocorreu em uma granja localizada na região sul do Brasil (29° 11' 48" S, 51° 19' 23" O), um surto sugestivo da MD em poedeiras comerciais previamente vacinadas contra a MD (cepas vacinais combinadas Rispens/CVI988 e HVT/FC-126). A granja possuía uma população de aproximadamente 200.000 poedeiras comerciais, com um sistema de produção em núcleos de aves com múltiplas idades (aves de 1 a 90 semanas de idade).

O sistema de produção era dividido em duas fases: crescimento e produção. As aves eram adquiridas com um dia de idade de uma empresa de genética. A fase de crescimento é subdividida em cria, do alojamento de aves de 1 dia até 4 semanas de idade, com a criação em aviário com piso de chão batido utilizando maravalha como substrato para a cama, e esta, sendo reutilizada por sucessivos lotes; e a recria em aviários com o sistema de baterias de gaiolas (5-15 semanas de idade). Na fase de produção a criação é em aviários com os sistemas de baterias de gaiolas (16-90 semanas de idade).

O lote afetado era formado por 22.323 poedeiras. Às 38 semanas de idade, 35 aves (0,16%, 35/22323), apresentaram sinais clínicos neurológicos e consequente dificuldade locomotora, mortalidade e queda na produção de ovos. Os sinais clínicos neurológicos como paralisia total ou unilateral das patas associado ao aumento na taxa de mortalidade de 0,16% por semana e a queda na produção de ovos de 2,24% por semana, foram as evidências iniciais para atribuir ao envolvimento com a MD.

Em um lote anterior, no ano de 2014, onde as aves foram alojadas no mesmo aviário e sem a prática de realizar a limpeza e desinfecção das instalações nos intervalos entre os lotes, foram relatados mortalidade e sinais clínicos sugestivos da MD, mas sem a investigação e diagnóstico comprovado.

As aves foram vacinadas para a prevenção da MD com as cepas vacinais Rispens/CVI988 e HVT/FC-126. Ambas as cepas com títulos mínimos de 1500 PFUs/dose (unidades formadoras de placa). A vacinação foi realizada no incubatório da empresa de genética, com as aves possuindo 1 dia de idade e a aplicação sendo via subcutânea na região do pescoço. O acompanhamento do processo de aplicação da vacina foi realizado *in loco*, como atividade de rotina do incubatório, mas nenhuma monitoria utilizando técnicas sorológicas e ou moleculares foi realizada após o processo de vacinação para verificar a eficácia da vacina.

Necrópsias, análise das patologias e amostras biológicas

Os procedimentos foram realizados em conformidade com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil - No. 35326. A necropsia, os exames patológicos e a coleta das amostras biológicas foram realizadas na própria granja, logo após a contenção física manual das aves para a realização da eutanásia por deslocamento cervical.

Primeiramente, para a coleta de amostras para a análise histopatológica, foram necropsiadas cinco aves com sinais clínicos neurológicos compatíveis com a MD. Após a análise das patologias, principalmente os tumores em fígado, rins e intestino, as amostras foram coletadas de diferentes tecidos: encéfalo, nervo ciático, rins, pâncreas, ovário, oviduto e fígado; e armazenadas em frascos com formalina tamponada a 10%.

Para a detecção de ácidos nucleicos virais, foi realizada uma amostragem do lote para determinar o número de animais a serem necropsiados, seguindo a fórmula $n = \log(1-LC) / \log(1-p)$, onde n = número de amostras, p : prevalência estimada, LC : limite de confiança (Digiacomio & Koepsell, 1986), considerando uma prevalência esperada da enfermidade em 25% das aves (Schat & Nair, 2008) e limite de confiança de 95%. Aplicando-se a fórmula, foram considerados uma amostragem de dez aves do lote, sendo coletadas amostras de cinco aves com os sinais clínicos e tumores compatíveis com a MD e cinco aves saudáveis do mesmo lote. As amostras foram coletadas dos tecidos de órgãos com alterações anatomopatológicas e ou tumores: a pele com o folículo da pena, fígado, baço, rins e ovário; e armazenadas a -80°C até o processamento.

Histopatologia

Os fragmentos dos tecidos (2 cm dos tecidos lesados e normal adjacentes) foram fixados por 48 horas em formalina tamponada a 10% e processados para análises histológicas (Prophet et al., 1992). Fragmentos de tecidos foram incluídos em blocos de parafina, cortados a $3\mu\text{m}$ e coradas com hematoxilina e eosina (HE) (Allen, 1992). Em seguida, foram hidratados em uma série de concentrações decrescentes de álcool, coradas com HE e examinadas por microscopia óptica.

Preparo das amostras e extração do DNA para PCR e qPCR

As amostras coletadas de dez aves foram processadas em órgãos individualizados e pools de órgãos (fígado, baço, ovário, rins e pele/folículo da pena), conforme o objetivo e a técnica a ser realizada. Foram gerados 10 pools de órgãos, para a detecção dos agentes por PCR e suas variações (GaHV-2, ALV e REV) e qPCR para a cepa vacinal HVT/FC-126. Para a detecção e quantificação da carga viral do GaHV-2 por qPCR, as amostras foram processadas em órgãos individualizados, totalizando 35 amostras, divididos em dois grupos: aves afetadas pela MD (19 amostras) e aves saudáveis (16 amostras).

A extração do DNA total das amostras coletadas foi realizada por um procedimento padrão baseado em sílica/isotiocianato de guanidina (GuSCN) previamente descrito por Boom et al. (1990), utilizando um kit comercial (NewGene[®]; Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, RS, Brasil). Para tanto, fragmentos de órgãos, isolados ou em pools (fígado, baço, ovário, rim e pele/folículo da pena) foram macerados, homogeneizados com 1000 µL de solução de lise (GuSCN 5 M, Tris-HCl 0,1 M, EDTA 0,5 M and Triton X-100) e incubados a 56 ° durante 10 min. Logo após, 500 µL foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionados 20 µL de suspensão de sílica. Após centrifugação (8600 g por 30 segundos) o sobrenadante foi lavado duas vezes com 500 µL de solução tampão (GuSCN 5 M e Tris-HCl 0,1 M), duas vezes com 150 µL de etanol 75% e finalmente, uma vez com 150 µL de etanol absoluto. A suspensão de sílica foi seca a 56°- 60° C por 15 min. O DNA foi eluído com 50 µL de solução de TE (10 mM Tris HCl pH 8,0 e 1mM EDTA), incubado a 60° C por 5 min e a solução foi separada das partículas de sílica por centrifugação a 8600 x g por 3 min. Uma fração de cada amostra (5 µl) foi submetida à eletroforese em gel de agarose para avaliar a eficiência da extração. Apenas amostras com pelo menos 10 ng de DNA / 5 µl foram submetidas à amplificação. O DNA foi estocado a -20°C até ser utilizado nas reações de amplificação pela PCR e qPCR.

Amplificação do GaHV-2 por PCR

Os *primers*, específicos para o GaHV-2 (Tabela 1) e as condições da PCR, com algumas variações, foram realizadas conforme descrito por Becker et al. (1992). A PCR continha 1,5 mM MgCl₂; 1,2mM 10 × PCR 5pM de cada primer, 1,5 U Taq DNA polimerase, 0,07 mM dNTP, 1 mM Tris-HCl (pH 8,5), 50 mM KCl, 2µl do DNA da amostra e água Milli-Q esterilizada para completar um total volume de 30µl por reação. As reações foram realizadas sob as seguintes condições: 1 min a 94°C, seguido por 35 ciclos de 1,5 min a 94°C, 1min a 55°C e 2 min a 72°C. Cinco µl do DNA amplificado foram analisados em gel de agarose a 1%. Controles negativos foram incluídos em cada três reações de PCR e um controle positivo (cepa vacinal Rispens/CVI988) em cada conjunto de reações realizadas. Para evitar a contaminação, diferentes locais foram usados para conduzir as extrações de DNA, preparação dos reagentes e análises dos resultados. A PCR para a detecção do genoma de GaHV-2 foi desenvolvida para detectar e diferenciar cepas patogênicas do GaHV-2 das cepas atenuadas (cepas de campo não patogênicas e cepa vacinal Rispens/CVI988) (Becker et al., 1992, Silva, 1992). Os produtos da amplificação da PCR do fragmento *Bam*HI-H (Bradley

et al.,1989) de sequências repetitivas de nucleotídeos de 132 pb, repetições estas associadas com a atenuação viral e perda de oncogenicidade, foram utilizadas para auxiliar a diferenciação das cepas (López-Osório et al., 2017). O *primer* senso (*primer sense* – *Forward*, F) está localizado a 65 pb a montante 5' das repetições de 132 pb, e o *primer* anti-senso (*primer anti-sense* – *Reverse*, R) está localizado a 105 pb a jusante 3' da região. O fragmento genômico *Bam*HI-H de sequência repetitiva de 132 pb do GaHV-2 é comum às cepas de campo e a vacinal Rispens/CVI988, e o que diferencia as cepas são as repetições da banda de 132 pb (Becker et al., 1992). Os produtos da PCR foram analisados em eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% a 150 V por 4 horas e os géis foram revelados por coloração com nitrato de prata (Sambrook & Russel, 2001).

A qPCR para GaHV-2 e HVT/FC-126

A qPCR foi realizada para a quantificação absoluta das cópias do genoma viral, previamente descrita por Islam et al. (2006). Os *primers* e as sondas específicos de GaHV-2 e HVT/FC-126 utilizadas na qPCR foram reportados por Islam et al. (2004) e o controle interno que detecta o gene para o colágeno $\alpha 2$ (VI) de galinha por Koller et al. (1991) (Tabela 1).

Para a detecção de genomas da cepa vacinal HVT/FC126, os *primers* e sondas foram projetados para amplificar o gene SORF1 (Kingham et al., 2001). Este gene está presente apenas no MeHV-1 (Afonso et. al. 2001). Neste estudo foi utilizado somente a detecção qualitativa do MeHV-1 para identificar a presença da cepa vacinal HVT/FC 126 nas amostras, como forma de monitoria de uma das cepas utilizadas no programa vacinal das poedeiras comerciais.

Para a detecção e quantificação do GaHV-2, os *primers* e sondas foram projetados para amplificar o gene *Meq* (Kung et al., 2001). Este gene é ausente no GaHV-3 e MeHV-1, identificado como um excelente candidato para detecção específica de GaHV-2 usando a qPCR (Islam et al., 2004). O controle interno foi utilizado para possibilitar a quantificação absoluta do GaHV-2 em relação ao número de células do hospedeiro (\log_{10} cópias/milhão de células de galinha). Como controles positivos, foram utilizadas amostras de DNA de baço de frangos positivos para GaHV-2 e a cepa vacinal HVT/FC-126, e como controle interno foi utilizado o DNA extraído de sangue de galinha (Boom et al., 1990). Todas as reações de amplificação foram realizadas em um StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Norwalk, CT) utilizando um volume final de 30 μ L, contendo 15 μ L TaqMan Universal PCR Master Mix, 0,25 μ M de cada primer, 0,12 μ M de cada sonda correspondente e

5µL da amostra de DNA. Os parâmetros dos ciclos utilizados foram: 1 ciclo de 37 °C for 30 min, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 15 s e anelamento/extensão a 60°C for 1 min. Os dados das reações foram analisados quantitativamente, utilizando-se o StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems).

Tabela 1 – Sequências dos *primers* utilizados na PCR (Becker et al.,1992) e dos *primers* e sondas utilizados na qPCR (Islam et al., 2004; Islam et al., 2006).

Alvo: Gene/Vírus	Ensaio	Sequências de <i>primers</i> e sondas	Amplicon
Fragmento <i>Bam</i> HI-H de GaHV-2	PCR	F primer: 5' - TACTTCCTATATAGATTGAGACGT - 3' R primer: 5' - GAGATCCTCGTAAGGTGTAATATA - 3'	434 pb
Gene <i>Meq</i> / GaHV-2	qPCR	F primer: 5'-GGAGCCGGAGAGGCTTTATG- 3' R primer: 5'-ATCTGGCCCCGAATACAAGGAA- 3' Sonda: 5'-(FAM)CGTCTTACCGAGGATCCCGAACAGG (BHQ-1)- 3'	67 pb
Gene SORF1 / HVT (MeHV-1)	qPCR	F primer: 5' -GGCAGACACCGCGTTGTAT- 3' R primer: 5'-TGTCCACGCTCGAGACTATCC- 3' Sonda: 5'-(CY5) AACCCGGGCTTGTGGACGTCTTC (BHQ-3)- 3'	76 pb
Gene α2 (VI) colágeno de galinha	qPCR	F: 5'- GGGAACTGGAGAACCCAATTTT - 3' R: 5'- CGTGCCGCTGTCTCTACCAT - 3' Sonda: 5- (VIC) CCCTTAAGTACTGAGTTCCCCAGCTACTGCAG (MGB) - 3'	75 pb

Diagnóstico diferencial - ALV e REV

Para o diagnóstico da ALV, foi realizada a amplificação por *Nested-PCR* conforme descrito por Garcia *et al.* (2003), que visa a amplificação de ALVs exógenos. A reação foi realizada em duas etapas consecutivas no termociclador Veriti® 96 *Thermal Cycler* (Applied Biosystems®, Norwalk, CT, USA). Para a detecção do genoma do REV, a PCR amplifica grandes sequências repetitivas dos nucleotídeos (*large terminal repeat* – LTR) de REV. O ensaio foi realizado a partir do DNA extraído diretamente das amostras clínicas, conforme descrito previamente por Aly *et al.* (1993). A amplificação foi realizada no termociclador Veriti® 96 *Thermal Cycler* (Applied Biosystems®, Norwalk, CT, USA).

RESULTADOS

Achados epidemiológicos, clínicos e patológicos

Os achados epidemiológicos revelaram que, em relação à idade das aves, a MD ocorreu em aves mais velhas, às 38 semanas de idade, após o pico de produção de ovos (93,65% às 35 semanas de idade), e persistiu até as 48 semanas de idade, totalizando 11 semanas de incidência da enfermidade (Figura 1). A prevalência no período foi de 1,72% (385/22323). A mortalidade foi moderada, com média de 0,33% (74/22323) por semana e acumulada de 9% as 90 semanas de idade. A redução na produção de ovos semanal foi de 2,24% (3.500 ovos/semana), com perda de 0,44% da produção total de ovos (38.500/8.727.497) em 90 semanas.

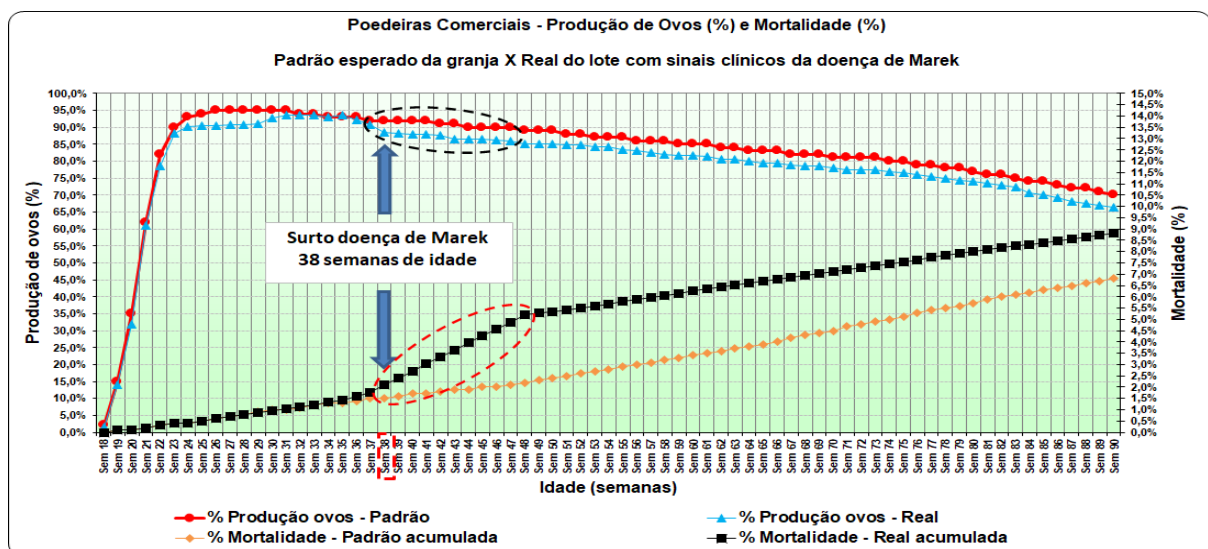


Figura 1. Produção de ovos (%) e mortalidade (%) por idade (semanas). Curva padrão esperada do lote (histórico da empresa) e real do lote de 22.323 poedeiras comerciais acometidas pela doença de Marek.

Os achados clínicos revelaram um comprometimento neurológico nas aves, como a paralisia unilateral e completa das patas (Figura 1a) e consequente dificuldade locomotora, assim como, outros sinais não específicos como a perda de peso, depressão, letargia, palidez e diarreia. O curso clínico da doença foi de 24 a 48 horas.

Os achados patológicos, na necropsia, evidenciaram as lesões macroscópicas nos nervos periféricos, com o espessamento unilateral do nervo ciático e a formação de tumores nodulares e difusos em diversos órgãos. As lesões macroscópicas foram evidenciadas em aproximadamente 1,72% (385/23460) das aves do lote. Os nódulos neoplásicos foram

observados especialmente no fígado (Figura 2b) e nos rins (figura 2c), e no intestino e nos ovários. Outras alterações patológicas como aerossaculite, salpingite, ovários pálidos e esplenomegalia, foram identificadas. À histopatologia foram observadas as disfunções nos nervos periféricos, nos tecidos e órgãos, como rins, encéfalo, ovários e oviduto. O nervo ciático apresentou uma intensa quantidade de linfócitos pleomórficos entre as fibras nervosas (Figura 2d). No encéfalo detectou-se moderada a acentuada formação de manguitos perivascularres em áreas multifocais compostos por diversas camadas de linfócitos neoplásicos. Nos rins e pâncreas foram observadas intensas quantidades de linfócitos pleomórficos por toda a extensão do parênquima. Nos ovários, uma severa quantidade de células linfocíticas pleomórficas no estroma associado à atrofia e ausência de folículos. No oviduto, uma intensa quantidade de linfócitos pleomórficos em áreas multifocais. Os achados epidemiológicos, clínicos e patológicos foram compatíveis com a MD no lote de 22.323 poedeiras comerciais vacinadas.

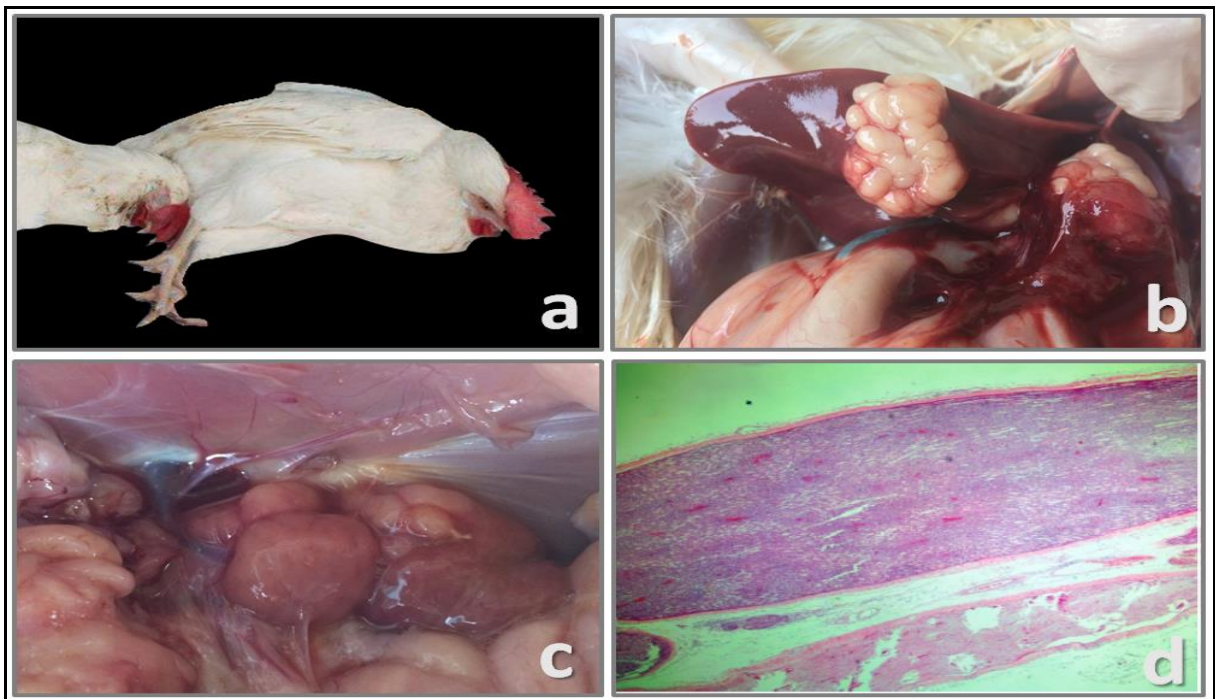


Figura 2: Sinais clínicos neurológicos, lesões macroscópicas e lesões microscópicas compatíveis com a doença de Marek em poedeiras comerciais com 38 semanas de idade. a: paralisia completa das patas. b: nódulos neoplásicos no fígado com distribuição multifocal. c: nódulos neoplásicos nos rins. d: nervo ciático com linfócitos pleomórficos entre as fibras nervosas (HE 40x).

Detecção de GaHV-2 por PCR

A PCR *Bam*H1-H de sequências repetitivas de nucleotídeos da banda de 132 pb resultou na detecção de 4 amostras (4/10, 40%), sendo estas, das aves com sinais clínicos e presença de tumores (Tabela 2). A PCR amplificou um produto de 566 pb, três sequências repetitivas de nucleotídeos de 132 pb, que está associado à cepa patogênica de GaHV-2. Não foi detectada a cepa vacinal Rispens/CVI988 nas amostras.

Detecção qualitativa do HVT e a quantificação de GaHV-2 pela qPCR

A amplificação de um segmento do gene *SORF1* confirmou a detecção da cepa vacinal HVT/FC126 em 6 de 10 amostras (60%), com um *Ct* médio de 35,58. Nas aves afetadas pela MD em 2 de 5 amostras, com *Ct* médio de 37,50 e nas aves saudáveis em 4 de 5 amostras, com *Ct* médio de 34,47.

A amplificação de um segmento do gene *Meq*, responsável pela oncogenicidade, confirmou a presença do GaHV-2 patogênico detectado na PCR. Um total de 54,29% (19/35) das amostras de órgãos foram positivas para GaHV-2 por qPCR, com uma média de $10^{2,26}$ cópias/milhão células (mínimo $10^{0,8}$ e máximo de $10^{7,74}$ cópias). Nas aves afetadas pela MD um total de 94,74% (18/19) das amostras foram positivas para GaHV-2, com uma média de $10^{6,19}$ cópias (mínimo $10^{2,68}$ e máximo de $10^{7,74}$ cópias). Nas aves saudáveis, 1 das 16 amostras (6,25%) foram positivas para GaHV-2, com uma carga viral de $10^{0,8}$ cópias (Tabela 2).

Tabela 2 – Os resultados da PCR convencional (GaHV-2) e da PCR em tempo real (GaHV-2 e cepa vacinal HVT/FC-126).

Objetivos/Alvo				Detecção e quantificação GaHV-2	Monitoria vacina HVT/FC-126	Detecção GaHV-2 e monitoria vacina Rispen/CVI988
Técnicas				qPCR	qPCR (Ct)	PCR
Ave	Status	Nº	Tecido	GaHV-2	HVT/FC-126	GaHV-2
1	Saudável	1	Baço	-		
		2	Fígado	-	-	-
2	Saudável	3	Baço	-		
		4	Fígado	-	36,91	-
		5	Ovário	-		
3	Saudável	6	Baço	-		
		7	Fígado	-	33,53	-
		8	Ovário	-		
		9	Rins	-		
4	Saudável	10	Baço	10 ^{0,8}		
		11	Fígado	-	32,33	-
		12	Ovário	-		
5	Saudável	13	Baço	-		
		14	Fígado	-	35,71	-
		15	Ovário	-		
		16	Rins	-		
6	Doente	17	Baço	10 ^{5,4}		
		18	Fígado	10 ^{7,3}		
		19	Ovário	10 ^{7,0}	-	+
		20	Pele/pena	10 ^{4,2}		
		21	Rins	10 ^{7,0}		
7	Doente	22	Baço	10 ^{7,3}		
		23	Fígado	10 ^{7,4}	37,23	+
		24	Ovário	10 ^{7,7}		
8	Doente	25	Fígado	10 ^{3,1}		
		26	Ovário	-	37,78	-
		27	Rins	10 ^{2,7}		
9	Doente	28	Baço	10 ^{6,4}		
		29	Fígado	10 ^{5,5}		
		30	Ovário	10 ^{6,9}	-	+
		31	Pele/pena	10 ^{6,2}		
10	Doente	32	Rins	10 ^{7,0}		
		33	Fígado	10 ^{7,0}		
		34	Ovário	10 ^{7,4}	-	+
		35	Pele/pena	10 ^{6,7}		
Médias				10^{2,26}	35,58	
Controles +				10^{6,8}	29,96	

qPCR GaHV-2 – amostras individuais; qPCR HVT/FC-126 / PCR GaHV-2 / *Nested* PCR ALV / PCR REV - amostras em pools. qPCR GaHV-2 - log₁₀cópias/milhão células; qPCR HVT/FC-126 - *Cycle threshold* (Ct); - negativo; + positivo.

Os genomas de GaHV-2 foram detectados em maior e com cargas virais mais altas nas aves afetadas pela MD do que nas aves saudáveis do mesmo lote, com média de $10^{6,19}$ cópias/milhão células e variação entre os tecidos de $10^{2,68}$ e $10^{7,74}$ cópias/milhão células (Figura 2a). O baço das aves afetadas pela MD foi o órgão com maior carga viral (média de $10^{6,37}$ cópias/milhão células), seguido por fígado ($10^{6,06}$ cópias/milhão células) e ovário ($10^{5,82}$ cópias/milhão células) (Figura 2b).

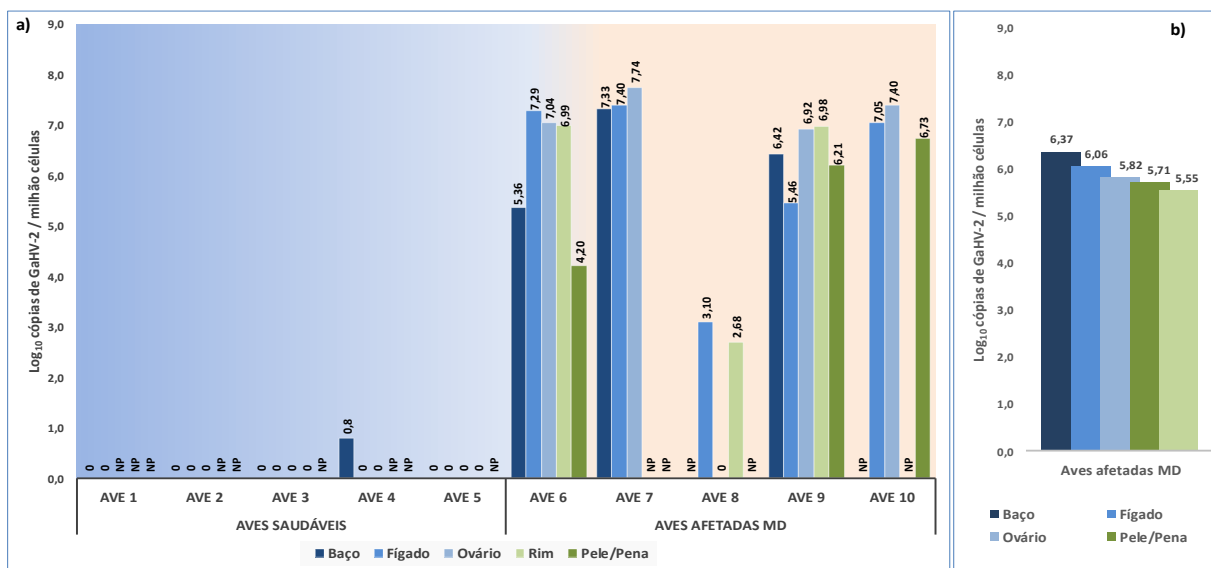


Figura 3. Quantificação da carga viral por qPCR nos diferentes tecidos. a) Comparação da carga viral de GaHV-2 (\log_{10} cópias/milhão células galinha) nos diferentes tecidos de aves afetadas pela MD e saudáveis b) Carga viral de GaHV-2 (\log_{10} cópias/milhão células galinha) nos diferentes tecidos das poedeiras comerciais afetadas pela MD.

No diagnóstico diferencial, todas as aves foram negativas para o vírus da Leucose Aviária (ALV) e para o vírus da Reticuloendoteliose (REV), sendo descartada a hipótese do envolvimento de outras enfermidades oncogênicas.

DISCUSSÃO

O diagnóstico do surto esporádico da MD em poedeiras comerciais vacinadas foi baseado nos achados epidemiológicos, clínicos, patológicos e moleculares. Os resultados dos critérios de diagnóstico utilizados foram compatíveis com o descrito na literatura para a confirmação da MD (Witter & Schat, 2003; Nair, 2005; Islam et al., 2006; Gimeno, et.al, 2013; Gimeno & Schat, 2018).

Em poedeiras adultas na fase de produção de ovos, a MD pode ocorrer antes do pico de produção de ovos (18-30 semanas de idade) (Zhuang et al., 2015; Eid et al., 2019.) ou após o pico de produção de ovos, acima de 40 semanas de idade (Morrow & Feller, 2004; Ikezawa et al., 2010). Os surtos da DM em poedeiras comerciais e matrizes adultas são classificados como MD tardia (Witter & Gimeno 2006; Ikezawa et al., 2010). Na epidemiologia deste surto, em relação a idade das aves, a MD ocorreu em aves mais velhas, às 38 semanas de idade, após o pico de produção de ovos, sendo caracterizada como MD tardia em poedeiras comerciais adultas. No entanto, não está claro se os surtos são causados por desafios recentes com cepas altamente virulentas (vv e vv+) de MDV circulantes na granja (hipótese da nova infecção) ou devido a algum fator ambiental que exarceba uma infecção antiga ou latente do MDV (hipótese da infecção antiga) (Witter & Gimeno 2006).

A hipótese da infecção recente do MDV, designada por Witter (2001) como a "teoria da nova infecção", implica que os lotes de galinhas comerciais adultas são susceptíveis a uma nova infecção (superinfecção) com estirpes altamente virulentas, apesar de existirem níveis de imunidade à vacina e resistência à idade, que induzem tumores nas aves. A alternativa hipótese da infecção antiga, também originalmente designada por Witter (2001) como a "teoria da velha infecção", é que os surtos são induzidos por cepas do MDV residentes no lote por períodos de tempo variáveis, que sugere ser de uma infecção no início da vida das aves, que são desencadeados ou exacerbados em aves adultas por fatores ambientais imunossupressores, difíceis de serem exatamente estabelecidos. Neste lote, como as poedeiras comerciais foram vacinadas com as cepas (Rispen/CVI988 e HVT/FC-126), possivelmente infectadas precocemente pelo MDV circulante (histórico MD lote anterior), indicativos de falhas na vacinação (discussão em seguida) e o pico de produção de ovos como fator imunossupressor, não infeccioso, desencadeante, sugere o envolvimento da "teoria da velha infecção". Assim, é previsto que a introdução recente (nova infecção) ou contemporânea (velha infecção) de cepas altamente virulentas em lotes comerciais não seria suficiente para induzir a MD clínica, a menos que uma proporção do lote não tivesse imunidade protetora suficiente (Witter & Gimeno, 2006). A imunidade protetora das vacinas de MD permanecem por longos períodos (Witter & Offenbecker, 1978). Entretanto, maiores estudos precisam ser realizados para comprovar esta teoria, pois tanto a vacina como o desafio de MDV persistem durante toda a vida das aves, e outros fatores que influenciam a susceptibilidade das galinhas ao desafio são importantes e difíceis de serem identificados (Ikezawa et al., 2010; Mete et al., 2016).

Aqui, em aves de 38 semanas de idade, a incidência foi de 1,72% (385/22323), no período de 11 semanas. Os resultados estão de acordo com a fase de ocorrência da MD (Schatt & Nair, 2008). A susceptibilidade ao MDV é maior em aves mais jovens do que em aves mais velhas. As exposições até 12 semanas de idade resultaram em incidência da MD entre 42% a 45%, 13 a 20 semanas em 8% e de 33 a 55 semanas em 6% (Vielitz & Landgraf, 1970; Davidson & Nair, 2004; Witter & Gimeno, 2006).

Na forma clássica da doença, comum em aves mais velhas (18 a 24 semanas de idade ou acima), os sinais clínicos geralmente observados são a paralisia unilateral ou total das patas, mortalidade de 10-15%, lesões macroscópicas nos nervos periféricos, principalmente com o espessamento do nervo ciático (Gimeno & Pandiri, 2013). Neste caso, de acordo com a forma clássica da MD, os sinais clínicos neurológicos foram a paralisia unilateral e completa das patas, com consequente dificuldade locomotora, a mortalidade do lote moderada de 0,33% por semana e acumulada de 9%. As lesões foram encontradas em 1,72% das aves, nos nervos periféricos, com o espessamento unilateral do nervo ciático. A redução na produção de ovos semanal foi de 2,24% (3.500 ovos/semana) e com a perda de 0,44% da produção total de ovos (38.500/8.727.497) em 90 semanas. As poedeiras infectadas por MDV sofrem uma perda da produção semanal de ovos em torno de 4,25% a 5% (Purchase, 1985; Rozins et al., 2019). Na forma aguda, comum em aves mais jovens (3 a 16 semanas de idade), é caracterizada por linfomas viscerais em múltiplos órgãos, incidência de 10 a 30% do lote e surtos de até 70% relacionados a cepas mais virulentas (Witter et al., 1999; OIE, 2017). Neste caso, a forma aguda da MD também foi detectada, com a presença de tumores nodulares e difusos nos diversos órgãos como fígado, rins, intestino e nos ovários. Os achados cursam com a forma clássica e, concomitantemente, com a forma aguda da MD, sendo a classificação mais adequada como síndrome neoplásica induzida pelo MDV, conforme recente definição por Gimeno & Pandiri (2013), onde as síndromes neoplásicas, são caracterizadas por sinais clínicos neurológicos, lesões nos nervos periféricos e a formação de linfomas na pele e nos tecidos como fígado, baço, pulmões e coração (Gimeno & Schat, 2018).

A histopatologia em tumores induzidos pelo MDV é considerada como uma das principais ferramentas de diferenciação de outros agentes potencialmente oncogênicos (Witter & Fadly, 2003). A presença de infiltração de células linfóides imaturas nos órgãos e a infiltração dos linfócitos T transformados nos nervos periféricos, com intenso processo inflamatório, correspondem à MD (Calnek & Witter, 1991; Puro et al., 2018). As alterações histológicas apresentadas neste estudo, como a presença de linfócitos pleomórficos entre as fibras nervosas do nervo ciático e a intensa quantidade de linfócitos pleomórficos nos

diferentes órgãos, rins, encéfalo, ovários e oviduto, estão de acordo com o padrão histológico das lesões já descritas e caracterizadas na literatura (Payne e Biggs, 1967; Prophet et al.1992).

Os pontos críticos do diagnóstico da MD foram revisados e as técnicas moleculares como PCR (Becker et al.,1992; Silva, 1992) e qPCR (Islam et al., 2004, Gimeno et al., 2005; Davidson et al., 2013; Baigent et al., 2016) foram incluídas como critérios para a comprovação do diagnóstico da MD (Gimeno & Schat, 2018). Neste estudo, a PCR *BamH1-H* de sequências repetitivas de nucleotídeos da banda de 132 pb para GaHV-2, resultou na detecção de 4 amostras (4/10, 40%), sendo estas, somente das aves com sinais clínicos e presença de tumores. Amplificou um produto de 566 pb (3 sequências repetitivas de nucleotídeos de 132 pb), que está associado a uma cepa patogênica de GaHV-2. As cepas patogênicas de GaHV-2 contêm apenas uma a três cópias da sequência repetitiva de 132 pb (Silva, 1992). Duas e três repetições de 132 pb, possuem patogenicidade semelhante e ambas causam retardo de crescimento e linfomas nas aves, estando associadas a cepas vv MDV e ou vv+ MDV (Silva, 1992; Tulman et al., 2000; Abd-Ellatieff et al., 2017). Aqui, a cepa vacinal Rispens/CVI988 não foi detectada em nenhuma das amostras. As cepas de baixa patogenicidade apresentam entre 6 e 7 repetições (962 a 1094 pb) e as cepas atenuadas como a vacinal Rispens/CVI988 podem chegar a 8 e ou 9 repetições (1325 pb) (Becker et al., 1992).

O desenvolvimento de métodos de qPCR que apresentam resultados de quantificação absoluta ou relativa do GaHV-2 e das cargas das vacinas utilizadas, Rispens/CVI988 e HVT/FC-126, são úteis ao diagnóstico da DM e na monitoria da eficácia das vacinas e vacinações (Islam et al., 2004; Islam et al., 2006a; Baigent et al., 2005; Gimeno et al., 2005; Baigent et al., 2016). Neste estudo, o resultado da PCR *BamH1-H* de GaHV-2 foi confirmado pela amplificação de um segmento do gene *Meq* do GaHV-2 na qPCR em 54,29% (19/35) das amostras, sendo que nas aves afetadas pela MD um total de 18 das 19 amostras (94,74%) e nas aves saudáveis apenas 1 das 16 amostras (6,25%). As cargas virais foram mais elevadas nas aves afetadas pela MD, média de $10^{6,19}$ cópias/milhão de células, quando comparada com as aves saudáveis com $10^{0,8}$ cópias (1 amostra de baço), ou seja, 5,39 logs mais elevadas. A q-PCR usada na análise de amostras de tumores demonstram que a carga do GaHV-2 é no mínimo cem vezes, 2 logs, mais elevada em aves que desenvolveram tumores do que nos tecidos não tumorais, e as diferenças podem ser detectadas em três semanas após o desafio (Islam et al., 2006). Os linfomas MD tiveram cerca de 10^2 vezes mais cópias de DNA do MDV ($10^{3,2}$ a $10^{4,3}$) do que qualquer um dos tecidos infectados latentemente por MDV ($10^{0,8}$ a $10^{1,2}$) (Gimeno et al., 2005).

As cargas virais de GaHV-2 encontradas por qPCR nos tecidos variam conforme a fase da patogenia que se encontra a infecção, pela cepa vacinal e ou de campo (Baigent et al., 2016). A carga viral de MDV em 5 dias após a infecção, fase citolítica inicial e ou latente ($10^{1,7}$ cópias), em 14 dias após a infecção, fase latente ($10^{4,2}$ cópias) e 28 a 35 dias, fase proliferativa ($10^{4,9}$ - $10^{5,0}$ cópias) (Islam et al., 2006). Aqui, as cargas virais nas aves afetadas pela MD apresentaram variação de $10^{2,68}$ a $10^{7,74}$ cópias, sendo que a maioria das aves (13/19) possuíam cargas acima de 10^6 cópias/milhão de células, associado a presença de tumores, caracterizando a ocorrência da fase proliferativa e ou de transformação (McPherson & Delany, 2016). A carga viral de $10^{0,8}$ cópias na ave saudável (ave 4) sugere que a infecção esteja na fase citolítica inicial e ou latente, e que pelo fato da carga viral de GaHV-2 em aves vacinadas apresentar carga abaixo de 10^2 cópias/milhão células, está associada à proteção MD (Islam et al., 2006b). O baço das aves afetadas pela MD foi o órgão com maior carga viral (média de $10^{6,37}$ cópias/milhão células), seguido por fígado ($10^{6,06}$ cópias) e ovário ($10^{5,82}$ cópias). A cinética distinta da detecção da cepa GaHV-2 demonstrada nos diferentes tecidos e ou órgãos, está relacionada com a replicação do GaHV-2 e o ciclo de disseminação viral no hospedeiro, sendo o baço um dos principais tecidos linfóides de migração viral após a infecção inicial do sistema respiratório (Schat & Nair, 2008).

A cepa HVT/FC 126 foi identificada por qPCR de 1 a 8 semanas (Islam et al., 2006) e em até 72 semanas após a vacinação (Palya et al., 2014). Neste estudo, na simulação de uma monitoria da vacinação, a amplificação para o gene SORF1, confirmou a detecção da cepa vacinal HVT/FC126, 38 semanas pós vacinação, em 6 das 10 amostras (60%). Em 4 das 10 amostras (40%) (ave saudável 1 e aves afetadas pela MD 6, 9 e 10), não foi detectada, sugerindo uma falha na vacinação. A cepa foi detectada em 40% dos casos analisados que não apresentaram sinais clínicos (aves saudáveis 2, 3, 4 e 5), que sugere que a cepa HVT/FC 126 foi eficaz no controle da MD, mesmo com a presença na cepa patogênica de GaHV-2 circulante na granja e detectada em uma ave saudável (ave 4; $10^{0,8}$ cópias de GaHV-2). Cepas patogênicas de GaHV-2 como JM e GA (v MDV) são igualmente virulentas (Purchase et al., 1971) e igualmente protegidas pela vacinação com a cepa HVT/FC-126 sozinha (Witter et al., 2005). Em contrapartida, a cepa HVT/FC-126 detectada, não foi eficaz em 20% dos casos analisados (aves afetadas pela MD; ave 7 com média de $10^{7,4}$ e ave 8 com $10^{2,9}$ cópias de GaHV-2), sugerindo que a cepa HVT/FC-126 sozinha, pois não foi detectada a cepa Rispens/CVI988, pode não conferir proteção para a cepa virulenta de GaHV-2 deste estudo. A cepa vacinal HVT/FC-126 sozinha ou combinada com HVT/FC-126 e SB-1 não conferem proteção às cepas virulentas vv MDVs e vv+ MDVs (Witter, 1997).

A cepa vacinal Rispens CVI/988 protege contra as cepas v MDV (ex: GA e JM) e contra cepas vv MDV (ex: RB-1B, Md5 e Md11) (Witter, 1997, Gimeno, 2008), entretanto, possui baixa eficácia na proteção contra as cepas vv+ MDV (Spatz et al., 2007; Cui et al., 2016; Zhang et al., 2017). As cepas vacinais Rispens CVI/988 e HVT/FC-126 combinadas, reduzem significativamente a carga viral de cepas patogênicas de GaHV-2 (v MDV e vv MDV) (Islam et al. 2006; Haq et al., 2012, Gimeno et al., 2015). Neste estudo, o programa vacinal combinado Rispens CVI/988 e HVT/FC 126, foi eficaz para o controle da MD em 98,27% das aves do lote e 1,72% sucumbiram a infecção pela cepa patogênica GaHV-2. Mesmo com a presença de uma cepa patogênica de GaHV-2, as aves podem ser refratárias ao desafio pela imunidade induzida pelas vacinas (Ikezawa et al., 2010). Entretanto, a cepa vacinal Rispens CVI/988 não foi encontrada em nenhuma das amostras, sugerindo uma falha na vacinação e não sendo possível determinar que a cepa patogênica de GaHV-2, possua um aumento na sua virulência com a respectiva superação da imunidade da cepa Rispens CVI/988. Estes resultados diferem das possíveis causas dos surtos de MD em aves vacinadas, onde que pela presença de cepas de maior virulência no campo, em outros países, sugerem que há um aumento na virulência e possível superação da imunidade conferida pelas vacinas combinadas Rispens CVI/988 e HVT-FC-126 (Kalyani et al., 2011; López-Osório et al., 2017, Puro et al., 2018). A presença de cepas patogênicas de GaHV-2 (vv MDV e vv+MDV), no Brasil (estado de Minas Gerais), nas aves industriais e de criação de vida livre, com proteção insuficiente pela utilização da cepa HVT-FC126 sozinha, também sugerem superação da imunidade das vacinas e que o aumento na virulência pode resultar na reemergência da MD (Torres et al., 2019). Para o estudo da evolução do MDV e sua relação como a superação da imunidade das vacinas, é necessária uma investigação mais aprofundada para determinar onde está a evolução evidente, que pode ser entendida analisando a frequência dos casos, a genética do hospedeiro, tempo de duração da criação, densidades de alojamento, sistemas de produção, qualidade das vacinas e fabricantes, estratégias de vacinação e biossegurança (Gimeno et al., 2015; Kennedy et al., 2017). Estudos mais amplos, com a frequente descrição dos casos, acesso e análise do processo de vacinação e análise da titulação das vacinas utilizadas necessitam ser realizados para entender as causas envolvidas com a não detecção e eficácia da vacina (Gimeno, 2008).

As explicações para as possíveis causas dos surtos esporádicos da MD e que podem influenciar na eficácia das vacinas, estão relacionadas, principalmente, às falhas nas medidas de biossegurança e na vacinação, e na evolução das cepas de MDV superando a imunidade das vacinas combinadas Rispens CVI/988 e HVT/FC-126 (Witter, 2011; Gimeno & Schatt,

2018). As falhas de biosseguridade na granja propiciam a exposição precoce ao MDV em poucos dias após a vacinação, antes do estabelecimento da imunidade completa conferida pelas vacinas (5 a 8 dias após a vacinação) e as infecções concomitantes com outros agentes imunossupressores, que interferem na eficácia das vacinas, como o vírus da anemia infecciosa das galinhas (*chicken infectious anemia virus*, CAV) (Yang et al., 2010; Zhang et al., 2017), o vírus da doença de gumboro (*infectious bursal disease virus*, IBDV) (Davidson, 2004) e micotoxinas nos alimentos (Kufuor-Mensah et al., 2016) (Schatt & Nair, 2008). Neste estudo, em relação a biosseguridade, foram encontradas falhas como o sistema de criação em múltiplas idades, e principalmente, o histórico do lote anterior com suspeita da MD, a não realização da limpeza e desinfecção no intervalo entre lotes e o alojamento em piso de chão batido utilizando maravalha como substrato para a cama, e esta, sendo reutilizada por sucessivos lotes na granja, sugerindo estas falhas de biosseguridade associadas a uma das causas da ocorrência deste surto esporádico da MD. Estas falhas de biosseguridade têm sido previamente associadas como uma das causas relacionadas à ocorrência de surtos da MD (Gimeno, 2008; Sousa, 2010; Zhang et al., 2015). O MDV pode estar presente na poeira e na cama do aviário, persistindo entre diferentes lotes (Kennedy et al., 2015; Rozins & Day, 2017) e por períodos entre 20 a 425 dias, sendo a substituição da cama entre lotes de poedeiras comerciais e matrizes, limpeza e desinfecção ferramentas importantes na prevenção de surtos da MD (Kennedy et al., 2018). Estudo longitudinal prospectivo da MD, avaliando os fatores de riscos em 171 lotes de 102 granjas de poedeiras comerciais, demonstrou que granjas com sistemas de produção com múltiplas idades aumentaram em 90% os riscos de surtos da MD e em 30% a mortalidade, quando comparados com sistema de idade única; fato também encontrado quando o alojamento foi em aviário com piso de chão batido, em comparação ao alojamento em baterias com gaiolas (Heier & Jarp, 2000). Em contraponto, lotes de aves vacinadas com Rispens/CVI988 e HVT/FC-126, com eficácia da vacinação comprovada pela monitoria com qPCR, e mantidas em granjas com rigorosa biosseguridade, foram livres da infecção pelo GaHV-2 e da MD (Davidson et al., 2017).

Em relação à vacinação, falhas na imunização das aves podem ocorrer, por uma dose da vacina insuficiente para induzir a imunidade protetora contra MDV (Gimeno et al, 2011); pelo erro na aplicação da vacina pela via subcutânea e ou *in ovo* (Landman & Verschuren, 2003; Lee et al., 2011; Gimeno & Schatt, 2018); e ou pela evolução da virulência das cepas de MDV, através da emergência de cepas vv MDV e vv+ MDV, que superam a imunidade induzida pelas cepas vacinais Rispens/CVI988 e HVT/FC-126 (Witter, 1997; Gimeno & Schatt, 2018). Neste caso, foi identificadas falhas na vacinação, devido a não detecção da cepa

HVT/FC-126 nas aves afetadas pela MD (aves 6, 9 e 10) e a não detecção da cepa Rispens/CVI 988 em todas as amostras, sugerindo a vacinação como uma das causas da ocorrência deste surto esporádico da MD. Na vacinação, os fatores que devem ser avaliados são o programa vacinal (cepas sozinhas e ou associadas), titulação das vacinas utilizadas (dose mínima de 1500 PFUs) e o processo de preparo e aplicação das vacinas (Gimeno, 2008). As falhas na vacinação por uma dose de vacina insuficiente, ocorre devido as falhas na administração das vacinas: manipulação incorreta (ampolas congeladas, acondicionadas em nitrogênio líquido a -196°C), condições de descongelamento impróprias, reconstituição em diluentes inadequados, mistura com antibióticos, administração conjunta com outras vacinas, longos atrasos na vacinação após a reconstituição (Gimeno et al., 2011). Além da dose administrada; foram relatadas diferenças na capacidade de proteção da CVI988 de diferentes fabricantes (Witter & Kreager, 2004), sendo necessário uma dose maior de uma vacina menos protetora para obter uma proteção adequada (Gimeno et al., 2015). Não foi possível, neste caso, avaliar as condições do processo vacinal e identificar as causas envolvidas com estas falhas vacinais, devido ao acesso restrito ao incubatório responsável pela vacinação.

Neste estudo foi relatado um surto esporádico da MD em poedeiras comerciais vacinadas, no sul do Brasil, através dos achados epidemiológicos, clínicos, patológicos e moleculares. O surto esporádico foi caracterizado como MD tardia e classificado como síndrome neoplásica induzida pelo MDV. A presença de uma cepa patogênica de GaHV-2 foi comprovada com duas técnicas moleculares, a PCR *Bam*H1-H de sequências repetitivas de nucleotídeos da banda de 132 pb e a qPCR para o gene *Meq* do GaHV-2. A cepa patogênica do GaHV-2 está circulante no sistema de produção de poedeiras comerciais, no sul do Brasil. A infecção continua causando, mesmo em aves vacinadas para a MD, sinais clínicos e lesões características, e conseqüentemente, pela mortalidade e queda na produção de ovos, perdas econômicas aos produtores e a indústria de ovos. A carga do GaHV-2 é 5,39 logs mais elevada nas poedeiras comerciais que desenvolveram tumores. As causas deste surto esporádico da MD, que influenciaram na eficácia das vacinas combinadas Rispens/CVI988 e HVT/FC-126, foram as falhas na biossegurança e na vacinação, não estando associado ao aumento da virulência da cepa de GaHV-2 envolvida.

A ocorrência de surtos esporádicos da MD recomendaria realizar estudos futuros que relatem com maior frequência os casos ocorridos, para que possam ser realizadas as análises de todas as possíveis causas desta ocorrência. Sugere-se utilizar a qPCR como ferramenta de monitoria do programa vacinal de poedeiras comerciais, de 14 a 28 dias após a vacinação para a MD. Monitorar a qualidade e a titulação das vacinas utilizadas. Estruturar um programa de

biosseguridade rígido, que contemple a substituição da cama das aves em todos os lotes de poedeiras comerciais alojadas em aviários com pisos, construção de pisos de alvenaria nos aviários, realizar a limpeza e desinfecção das instalações no intervalo entre os lotes e realizar o alojamento de aves em idade única no aviário e na granja. Realizar treinamentos periódicos sobre boas práticas de produção e vacinação, com as equipes responsáveis pelas atividades nas granjas de produção de ovos e equipes responsáveis pelo processo de vacinação no incubatório.

REFERENCIAS

Abd-Ellatieff, H. A., Abou-Rawash, A. A., Ellakany, H. F., Goda, W. M., Suzuki, T., Yanai, T. 2017. Molecular characterization and phylogenetic analysis of a virulent Marek's disease virus field strain in broiler chickens in Japan. *Avian Pathology*, v.1:1-10.

Afonso, C. L.; Tulman, E. R., Lu, Z.; Zsak, L.; Rock, D. L.; Kutish, G. F.. 2001. The genome of turkey herpesvirus. *Journal of Virology* 75:971–978.

Allen, T.C. 1992. Hematoxylin and Eosin. In: Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B. & Sobin L.H. (ed.) *Laboratory Methods in Histotechnology*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, p.53–58.

Aly, M. M., Smith, E. J.; Fadly, A. M. 1993. Detection of reticuloendotheliosis virus infection using the polymerase chain reaction. *Avian Pathology*. 22: 543-554.

Baigent, S. J. Petherbridgea, L.J.; Howesa, K.; Smitha,L.P; Currieb,R.J.W.; Nair, V.K. 2005. Absolute quantitation of Marek's disease virus genome copy number in chicken feather and lymphocyte samples using real-time PCR. *Journal of Virological Methods*. v. 123, p. 53-64.

Baigent, S.J.; Nair, V.K.; Galludec, H.L. 2016. Real-time PCR for differential quantification of CVI988 vaccine virus and virulent strains of Marek's disease virus. *Journal of Virological Methods*, v. 233, p. 23–36.

Bacon, L. D., Hunt, H. D., and Cheng, H. H. 2001. Genetic resistance to Marek's disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 255, 121–141.

Becker, Y., Asher, Y., Tabor, E., Davidson, I., Malkinson, M. & Weisman, Y. 1992. Polymerase chain reaction for differentiation between pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDV) and vaccine viruses of MDV-serotypes 2 and 3. *Journal of Virology Methods*, 40, 307-322.

Biggs, P.M.; Nair, V. 2012. The long view: 40 years of Marek's disease research and avian pathology. *Avian Pathol.* 41:3–9.

Boodhoo, N.; Gurung, A.; Sharif, S.; Behboudiet, S. 2016. Marek's disease in chickens: a review with focus on immunology. *Veterinary Research.* 47:119

Boom, R.; Sol, C.J.A.; Salimans, M.M.M.; Jansen, C.L.; Wertheim-van Dillen, P.M.E.; Van der Noordaa, J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology.* 28, 495-503.

BRASIL (2006) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 7, de 10 de março de 2006. Dispõe sobre o Regulamento técnico para a produção, o controle e o emprego de vacinas, antígenos e diluentes para uso na avicultura. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 20 de março de 2006. Disponível em: <<http://agricultura.gov.br>>. Acesso em: 15 de julho de 2016.

Calnek, B.W. 2001. Pathogenesis of Marek's disease virus infection. *Current Topics Microbiology and Immunology*, 255:25–55.

Canal, C. W.; Barbosa, T. M. 2009. Enfermidade de Marek, complexo leucótico aviário e reticuloendoteliose. In: Berchieri Junior, A.; Silva, E. N.; Di Fábio, J.; Sesti, L.; Zuanaze, M. A. F. *Doença das aves*. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia avícolas, cap. 5, p. 569-586.

CEESA. 2016. Executive Animal Health Study Center (Central and Eastern European Schools Association). Disponível em: www.ceesa.eu. Acesso em: fevereiro de 2017.

Churchill, A. E.; Payne, L. N., Chubb, R. C..1969. Immunization against Marek's disease using a live attenuated virus. *Nature.* 221:744–747.

Cui, N.; Su, S.; Sun, P.; Zhang, Y.; Han, N.; Cui, Z. 2016. Isolation and pathogenic analysis of virulent Marek's disease virus field strain in China. *Poultry Science* 95, 1521-1528.

Davidson, F. Marek's disease: an evolving problem. 2004. Elsevier Academic Press, London.

Davidson, I., Raibstein, I.; Al-Toury, A. 2013. Quantitation of Marek's disease and chicken anemia viruses in organs of experimentally-infected and of commercial chickens by multiplex real-time PCR. *Avian Diseases*, 57, 532–538.

Digiacomo, R.F.; Koepsell, T.D. 1986. Sampling for detection of infection of disease in a animal population. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 189:22-23.

Dunn, J.R.; Gimeno, I.M., 2013. Current status of Marek's disease in the United States and worldwide based on a questionnaire survey. *Avian Diseases*. 57, 483–490.

Dunn, J.R., Black Pyrkosz, A.; Cheng, H.H. 2016. Pathotyping of current Marek's disease virus field strains and identification of sequence variants to predict virulence. In: M. Bublot, C. Denesvre & J.-F. Vautherot (Eds.), 11th International Symposium on Marek's disease and Avian Herpesvirus (p. 10). Tours, France: INRA

Faiz, N. M.; Cortes, A.L.; Guy, J.S.; Fogle, J.E.; Gimeno, I.M. 2016. Efficacy of various Marek's disease vaccines protocols for prevention of Marek's disease virus-induced immunosuppression. *Vaccine*, 34, 4180–4187. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.06.061>.

Faiz, N. M.; Cortes, A.L.; Guy, J.S.; Fletcher, O.J.; Cimino, T.; Gimeno, I. M. 2017. Evaluation of factors influencing the development of late Marek's disease virus-induced immunosuppression: virus pathotype and host sex. *Avian Pathology*. Aug, 46(4):376-385.

Garcia M., J. El-Attrache, S. M. Riblet, V. R. Lunge, A. S. K. Fonseca, P. Villegas, and N. Ikuta. 2003. Development and application of reverse transcriptase nested polymerase chain reaction test for the detection of exogenous avian leukosis virus. *Avian Dis*. 47:41–53.

Gennart, I.; Coupeau, D.; Pejakovic, S.; Laurent, S.; Rasschaert, D.; Muylkens, B. 2015. Marek's disease: Genetic regulation of gallid herpesvirus 2 infection and latency. *The Veterinary Journal*,(3), 339-348.

Gimeno, I. M., R. L. Witter, A. M. Fadly, and R. F. Silva. Novel criteria for the diagnosis of Marek's disease virus-induced lymphomas. *Avian Pathology*. 34:332–340. 2005.

Gimeno, I. M.; Cortes; A.L.; Silva, R. F. 2008a. Load of challenge Marek's disease virus DNA in blood as a criterion for early diagnosis of Marek's disease tumors. *Avian Dis*. 52:203–208.

Gimeno, I.M. 2008b. Marek's disease vaccines: a solution for today but a worry for tomorrow. *Vaccine* 26 (Suppl. (3)), C31–41.

Gimeno, I.M.; Cortes, A. L.; Montiel, E.R.; Lemiere, S.; Pandiri, A.K. R. 2011. Effect of diluting Marek's disease vaccines on the outcomes of Marek's disease virus Infection when challenged with highly virulent Marek's Disease viruses. *Avian Diseases Digest: Vol. 6, No. 2*, pp. e17-e18.

Gimeno, I.M.; Pandiri, A.R. 2013. Virus-induced immunosuppression: Marek's disease virus infection and associated syndromes. In: Gimeno IM, editor. *Immunosuppressive diseases of poultry Zaragoza*. Servet-Group Asis; p.124–152.

Gimeno, I.M.; Cortes, A.L.; Faiz, N.M.; Barbosa, T.; Villalobos, T. Evaluation of Factors Influencing Efficacy of Vaccine Strain CVI988 Against Marek's Disease in Meat-Type Chickens. *Avian Diseases*, 59(3):400-409. 2015.

Ikezawa, M.; Goryo, M.; Sasaki, J.; Haridy, M.; Okada, K. 2010. Late Marek's disease in adult chickens inoculated with virulent Marek's disease virus. *J. Vet. Med. Sci.* 72:1539–1545.

Islam, A.; Harrison, B.; Cheetham, B.F.; Mahony, T.J.; Young, P.L.; Walkden-Brown, S.W. 2004. Differential amplification and quantitation of Marek's disease viruses using real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 119, 103–113.

Islam A.; Cheetham, B.F.; Mahony, T.J.; Young, P.L.; Walkden-Brown, S.W. 2006a. Absolute quantitation of Marek's disease virus and Herpesvirus of turkeys in chicken lymphocyte, feather tip and dust samples using real-time PCR. *J. Virol. Methods.* 132:127–134.

Islam, A. F.; Walkden-Brown, S. W.; Islam, A.; Underwood, G. J.; Groves, P. J. 2006b. Relationship between Marek's disease virus load in peripheral blood lymphocytes at various stages of infection and clinical Marek's disease in broiler chickens. *Avian Pathol.* 35:42–48.

Izumiya, Y.; Jang, H. K.; Ono, M. ; Mikami, T. 2000. A complete genomic DNA sequence of Marek's disease virus type 2, strain HPRS24. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 255:191–221.

Kennedy, D.A.; Cairns, C.; Jones, M.J., Bell, A.S.; Salathe, R.M.; Baigent, S.J.; Nair, V.K.; Dunn, P.A.; Read, A.F. 2017. Industry-wide surveillance of Marek's disease virus on commercial poultry farms. *Avian Dis.* 61, 153–164.

Kennedy, D.A., Dunn, P.A., Read, A.F., 2018. Modeling Marek's disease virus transmission: a framework for evaluating the impact of farming practices and evolution. *Epidemics.* <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2018.01.001>.

Kingham, B.F.; Zelnik, V.; Kopacek, J.; Majerciak, V.; Schmidt, C.J.; 2001. The genome of herpes virus of turkeys: comparative analysis with Marek's disease viruses. *J. Gen. Virol.* 82, 1123–1135.

Koller, E.; Hayman, A.R.; Trueb, B. 1991. The promoter of the chicken $\alpha 2$ (VI) collagen gene has features characteristic of house-keeping genes and of proto-oncogenes. *Nucl. Acids Res.* 19, 485–491.

Kufuor-Mensah, E.; Reed, W. M.; Sleight, S.; Pestka, J.; Fadly, A. M.; Dunn, J. R. 2016. Effects of T-2 toxin on turkey herpesvirus-induced vaccinal immunity against Marek's disease. *Avian Dis.* 60:56–62.

Landman, W. J.; Verschuren, S. B. 2003. Titration of Marek's disease cell-associated vaccine virus (CVI 988) of reconstituted vaccine and vaccine ampoules from Dutch hatcheries. *Avian Dis.* 47:1458–1465.

López-Osorio, S.; Piedrahita, D.; Espinal-Restrepo, M.A.; Ramírez-Nieto, G.C.; Nair, V.; Williams, S.M.; Baigent, S.; Ventura-Polite, C.; Aranzazu-Taborda, D.A.; Chaparro-Gutiérrez, J.J. 2017. Molecular characterization of Marek's disease virus in a poultry layer farm from Colombia. *Poultry Science* 0:1–11.

Marek, J. 1907. Multiple nervenentzündung (polyneuritis) bei hühnern. *Dtsch TierarztlWochenschr*; 15:417–21.

Mete, A., Gharpure, R., Pitesky, M.E., Famini, D., Sverlow, K.; Dunn, J.R. 2016. Marek's disease in backyard chickens, a study of pathologic findings and viral loads in tumorous and nontumorous birds. *Avian Diseases*, 60, 826–836.

Morrow, C.; Fehler, F.. 2004. Marek's disease: a worldwide problem. 2004. In: *Marek's disease: an evolving problem*. T. F. Davison and V. K. Nair, eds. Elsevier Academic Press, London, England. pp. 49–61.

Nair, V. 2005. Evolution of Marek's disease – a paradigm for incessant race between the pathogen and the host. *Vet. J.*, 170:175–183.

Nair, V. 2018. Spotlight on avian pathology: Marek's disease. *Avian Pathology*, Vol. 47, No. 5, 440–442.

Nakamura, H.; Sakaguchi, M.; Hirayama, Y.; Miki, N.; Yamamota, M.; Hirai, K. 1992. Protection against Newcastle disease by recombinant Marek's disease virus serotype-1 expressing the fusion protein of Newcastle disease virus. In: *Proceedings of the 4th international symposium on Marek's disease, 19th World's poultry congress*, vol. 1. p. 332–5.

Niemeyer, C.; Favero, C.M.; Shivaprasad, H.L.; Uhart, M.; Musso, C.M.; Rago, M.V.; et al.. 2017. Genetically diverse herpesviruses in South American Atlantic coast seabirds. *PLoS ONE* 12(6): e0178811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178811>.

Office International Epizooties - OIE. Marek's Disease in OIE Terrestrial Manual 2017. Disponível

em:<http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Healthstandards/tahm/2.03.13MAREKDIS>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2019.

Okazaki, W.; Purchase, H.G.; Burmester, B.R. 1970. Protection against Marek's disease by vaccination with a herpesvirus of turkeys. *Avian Dis.* 14, 413–429.

Payne, L.N.; Biggs, P.M. 1967. Studies on Marek's disease. II. Pathogenesis. *J Natl Cancer Inst* 39: 281-302.

Palya, V.; Tatar-Kis, T.; Mato, T.; Feldfoldi, B.; Kovacs, E.; Gardin, Y. 2014. Onset and long-term duration of immunity provided by a single vaccination with a turkey herpesvirus vector ND vaccine in commercial layers. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 158, 105–115.

Prophet, E.B.; Mills, B.; Arrington, J.B., Sobin, L.H. 1992. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC. 279 p.

Puro, K.U.; Bhattacharjee, U.; Baruah, S.; Sen, A.; Das, S.; Ghatak, S.; Doley, S.; Sanjukta, R.; Shakuntala, I. 2018. Characterization of Marek's disease virus and phylogenetic analyses of meq gene from an outbreak in poultry in Meghalaya of Northeast India. *VirusDisease*, Jun; 29(2):167-172.

Rauw, F., Van Borm, S., Welby, S., Ngabirano, E., Gardin, Y., Palya, V.; Lambrecht, B. 2015. Quantification of rHVT-F genome load in feather follicles by specific real-time qPCR as an indicator of NDV-specific humoral immunity induced by day-old vaccination in SPF chickens, *Avian Pathology*, 44:3, 154-161, DOI: 10.1080/03079457.2015.1018869.

Reddy, S.M.; Izumiyab, Y., Lupiani, B. 2016. Marek's Disease Vaccines: Current Status, and Strategies for Improvement and Development of Vector Vaccines. *Veterinary Microbiology*. In press. Nov 24.

Renz K.G., Islam A., Cheetham B.F., Walkden-Brown S.W. 2006. Absolute quantification using real-time polymerase chain reaction of Marek's disease virus serotype 2 in field dust samples, feather tips and spleens. *J. Virol. Methods.* 135:186–191.

Schat, K.A., Nair, V. 2008. Marek's disease. In: *Diseases of Poultry, Twelfth Edition*, Saif Y.M. et al., eds. Blackwell Publishing, Ames Iowa, USA, 452-514.

Silva, R. F. 1992. Differentiation of pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDVs) by the polymerase chain reaction amplification of the tandem direct repeats within the MDV genome. *Avian Diseases*, 36, 521–528.

Sousa, E. Registro da doença de Marek, Leucose aviária e doença infecciosa da bolsa na Região do Triângulo Mineiro, no período de 1999 a 2003. *PUBVET* 2010;4:27.

Tulman, E. R.; Afonso, C. L.; Lu, Z.; Zsak, L.; Rock, D. L.; Kutish, G. F. 2000. The genome of a very virulent Marek's disease virus. *J. Virol.* 74:7980–7988.

Vielitz, E.; Landgraf, H.. 1970. Contribution to the epidemiology and control of Marek's disease. *Deutsch. Tierärztl. Wochenschr.* 77:357–362.

Witter, R. L.; Lee, L. F.; Bacon, L. D.; Smith, E. J. 1979. Depression of vaccinal immunity to Marek's disease by infection with reticuloendotheliosis virus. *Infect. Immun.* 26:90–98.

Witter, R.L.; Gimeno, I.M.; Reed, W.M.; Bacon, L.D. 1999. An acute form of transient paralysis induced by highly virulent strains of Marek's disease virus. *Avian Diseases*;43(4):704–20.

Witter, R. L.; Schat, K. A. 2003. Neoplastic diseases: Marek's disease. In: Saif, Y. M., Barnes, H. J., Fadly, A. M., Glisson, J. R., McDougald, L. R.; Swayne, D.E. (Eds). *Diseases of poultry*. 11th ed. Ames: Iowa State University. p. 407-46.

Witter, R. L. 1997. Increasing virulence of Marek's disease virus. *Avian Dis.* 41:149–163.

Witter, R.L. 1988. Very virulent Marek's disease viruses: importance and control. In Proceedings of the 18th World's Poultry Congress (pp.92/97). Japan: Nagoya.

Witter, R. L.; Kreager, K.S. 2004. Serotype 1 viruses modified by backpassage or insertional mutagenesis: approaching the threshold of vaccine efficacy in Marek's disease. *Avian Dis.* 48:768–782.

Witter, R.; Gimeno, I. 2006. Susceptibility of adult chickens, with and without prior vaccination, to challenge with Marek's disease virus. *Avian Dis.* 50:354–365.

Witter, R. L. 2001. Protective efficacy of Marek's disease vaccines. In: Current topics in microbiology and immunology. K. Hirai, ed. Springer–Verlag, Berlin. pp. 58–90.

5. CAPÍTULO III

Este capítulo será apresentado sob a forma de artigo científico a ser submetido ao periódico *Brazilian Journal of Poultry Science*.

Análises metagenômicas em poedeiras comerciais saudáveis ou afetadas pela doença de Marek.

Erich Helfer Carvalho¹, Helton Fernandes dos Santos², Dany Mesa³, Paulo Michel Roehe¹

¹Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias (LCDPA), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

³Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

Análises metagenômicas em poedeiras comerciais saudáveis ou afetadas pela doença de Marek.

RESUMO

A doença de Marek (*Marek's disease*, MD), causada pelo *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2), é uma enfermidade de importância econômica à indústria avícola mundial. O sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing*; NGS) e o apoio de ferramentas de bioinformática, irão possibilitar uma melhor avaliação da interação de vírus imunossupressores, como o GaHV-2, sobre o microbioma das aves. O objetivo desse trabalho foi utilizar o NGS para analisar o microbioma de órgãos de poedeiras comerciais saudáveis e comparar estes achados com os obtidos em aves afetadas pela MD. Para isso, foi realizada uma comparação entre *pools* de tecidos, contendo fígado, baço e rins de aves afetadas pela MD com *pools* equivalentes de aves saudáveis. Após o NGS, foram gerados um total de 3,482,919 *reads* e analisados 116,030 *reads*, com uma média de 140 nt. Do total de *reads* de genomas de vírus eucariotos, 0,11% foram do grupo das aves afetadas MD e 0,02% das aves saudáveis. Dos genomas de bactérias 25,47% do grupo das aves afetadas MD e 0,61% das saudáveis. Nas amostras de aves afetadas pela MD, 90% dos *reads* corresponderam a genomas de membros da família *Herpesviridae*, a mais abundante, seguida por *Retroviridae* (7%), *Siphoviridae* (2%) e *Myoviridae* (1%). Nas amostras de aves saudáveis, a família viral mais abundantemente representada foi a *Retroviridae* (79%), seguida por *Siphoviridae* (14%) e *Myoviridae* (7%). Os *reads* de bactérias foram atribuídos a genomas de representantes de onze conhecidas famílias bacterianas. Foi demonstrado uma interação entre GaHV-2, membro da família *Herpesviridae*, e genomas de bactérias patogênicas de importância em saúde pública. Uma maior diversidade de genomas representativos da família *Campylobacteriaceae*, especificamente a espécie *Campylobacter jejuni* foi encontrada nas poedeiras afetadas pela MD (73,33%) e nas saudáveis (26,67%), e na família *Enterobacteriaceae*, as espécies *Escherichia coli* com 66,67% nas poedeiras afetadas pela MD e 33,33% nas saudáveis, e a *Salmonella enterica* subesp. *enterica* com 53,33% nas poedeiras afetadas pela MD e 46,67% nas saudáveis. Os achados deste estudo indicam que poedeiras comerciais afetadas pela MD possuem maior abundância de genomas representativos de famílias virais e bacterianas em órgãos, do que aves saudáveis. A infecção pelo GaHV-2 conduziu a uma modulação do microbioma dos órgãos das aves, favorecendo coinfeções de bactérias patogênicas de interesse em saúde pública, principalmente *C. jejuni* e *E. coli*.

Palavras-chave: doença de Marek, *Gallid alphaherpesvirus 2*, metagenômica.

ABSTRACT

Marek's disease (MD), caused by *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2), is a disease of economic importance to the global poultry industry. With Next Generation Sequencing (NGS) and the support of bioinformatics tools, they will enable a better evaluation of the interaction of immunosuppressive viruses, such as GaHV-2, on poultry microbiomes. The objective of this work was to use NGS to analyze the microbiome of healthy commercial layer organs and compare these findings with those obtained in commercial layers affected by MD. To this end, a comparison was made between tissue pools containing liver, spleen and kidneys of layers affected by MD and equivalent pools of healthy layers. After NGS, 3,482,919 reads were generated and 116,030 reads were analyzed, with a mean of 140 nt. Of the total eukaryotic virus genome reads, 0.11% were from the group of MD affected layers and 0.02% from healthy layers. Of the bacterial genomes 25.47% of the group of MD affected layers and 0.61% of healthy layers. In the samples of layers affected by MD, 90% of the readings corresponded to the genomes of members of the family *Herpesviridae*, the most abundant, and followed by *Retroviridae* (7%), *Siphoviridae* (2%) and *Myoviridae* (1%). In healthy layers samples, the most abundantly represented viral family was *Retroviridae* (79%), followed by *Siphoviridae* (14%) and *Myoviridae* (7%). Readings of bacteria were attributed to genomes of representatives of eleven known bacterial families. An interaction between GaHV-2, a member of the *Herpesviridae* family, and pathogenic bacteria genomes of public health importance was demonstrated. A greater diversity of representative genomes of the *Campylobacteriaceae* family, specifically the species *Campylobacter jejuni* was found in layers affected by MD (73.33%) and in healthy layers (26.67%), and in the family *Enterobacteriaceae*, the species *Escherichia coli* with 66.67% in layers affected by MD and 33.33% in healthy, and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* with 53.33% in layers affected by MD and 46.67% in healthy. The findings of this study indicate that commercial layers affected by MD have greater abundance of genomes representative of viral and bacterial families in organs than healthy layers. GaHV-2 infection led to a modulation of the poultry organ microbiome, favoring co-infections of pathogenic bacteria of public health interest, especially *C. jejuni* and *E. coli*.

Keywords: Marek's disease, biosecurity, *Gallid alphaherpesvirus 2*, vaccination.

INTRODUÇÃO

A doença de Marek (*Marek's disease*, MD) é uma doença altamente infecciosa oncogênica e imunossupressora. É de ocorrência e importância mundial, causando perdas estimadas em 1 a 2 bilhões de dólares anualmente para a indústria avícola (Nair, 2005). Causada pelo vírus da doença de Marek (*Marek's disease virus*, MDV), formalmente *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2), é um membro da ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Mardivirus* (ICTV, 2015; Baigent et al., 2016). De acordo com seu potencial patogênico, o GaHV-2 tem suas amostras classificadas como de baixa (*mild*, m MDV), alta (*virulent*, v MDV, muito alta (*very virulent*; vv MDV;) e altíssima virulência (*very virulent +*, vv+ MDV) (Witter et al., 2005; Gennart et al., 2015). O MDV infecta macrófagos e, principalmente, células B e T (McPherson & Delany, 2016). Após a infecção inicial do sistema respiratório, o MDV é transportado para os tecidos linfóides como a bursa de Fabricius, o timo e o baço (Schat & Nair, 2008).

Com este amplo espectro patogênico, alguns critérios foram estabelecidos para auxiliar no diagnóstico da MD (Mete et al., 2016). Os principais critérios são a idade das aves, ocorre tanto em aves jovens (3 a 16 semanas idade) como em adultas (18 a 24 semanas e acima), os sinais clínicos neurológicos e as lesões macroscópicas nos nervos periféricos e tumores nos órgãos (Witter & Schat, 2003). Na histopatologia, a infiltração de linfócitos pleomórficos no sistema nervoso e linfócitos neoplásicos nos órgãos (Witter & Fadly, 2003), e os métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR) e a PCR quantitativa em tempo real (*quantitative real-time PCR* – qPCR) que foram incluídos como critérios de diagnóstico definitivo da MD (Gimeno, et.al, 2005). Entretanto, estes métodos são mais limitados para a análise de múltiplos patógenos e para o entendimento da influência dos vírus imunodepressores sobre o microbioma das aves. Neste sentido, a abordagem metagenômica têm sido proposta por ser a mais acurada técnica para a identificar a abundância de comunidades virais e bacterianas em diferentes amostras biológicas (Li et al. 2018; Romero-Espinoza et al., 2018; Qiu et al., 2019).

A metagenômica é um campo de estudo em rápido crescimento, que foi expandida graças às tecnologias de sequenciamento de alto desempenho (*high throughput sequencing*; HTS) ou de nova geração (*Next Generation Sequencing*; NGS), que possibilitaram o sequenciamento de, em tese, todos microrganismos que contenham ácido nucléico em determinada amostra. Com isso, são gerados dados de sequências de nucleotídeos que são posteriormente analisados com o apoio de ferramentas de bioinformática (Simon & Daniel,

2011, Lu et al., 2017). O NGS pode ser utilizado para estimar a abundância de sequências representativas de táxons já estabelecidos através da avaliação da abundância de leituras ou *reads* e sua subsequente classificação (Lu et al., 2017).

Estudos utilizando o NGS revelaram que o GaHV-2 induz imunodepressão, ocasionando uma disbiose induzida e uma conseqüente alteração no microbioma intestinal das aves (Perumbakkam et al., 2014). Além desse, poucos estudos têm sido realizados da influência de vírus imunossupressores como o MDV sobre o microbioma das aves (Li et al. 2018). Conseqüentemente, há pouca informação a respeito do efeito do GaHV-2 sobre a diversidade de microrganismos em órgãos como fígado, baço e rins. O objetivo desse trabalho foi utilizar o NGS para analisar o microbioma de órgãos de poedeiras comerciais saudáveis e comparar estes achados com os obtidos em aves afetadas pela doença de Marek.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras biológicas

Pools de órgãos (fígado, baço e rins) foram coletados no ano de 2015 de poedeiras comerciais com 38 semanas de idade, de um lote de 22.323 aves em uma granja comercial de produção de ovos na região sul do Brasil (29° 11' 48" S, 51° 19' 23" O). A granja possuía uma população total de aproximadamente 200.000 poedeiras comerciais. As poedeiras foram adquiridas de uma empresa de genética e vacinadas para o controle da MD no incubatório com 1 dia de idade via subcutânea, com as cepas vacinais Rispens/CVI988 e HVT/FC 126.

Foram coletadas amostras de cinco aves afetadas pela MD que apresentaram sinais clínicos neurológicos (paresia unilateral e completa das patas), lesões nos nervos periféricos e tumores nodulares e difusos nos órgãos. Como controles, foram coletados pools equivalentes de cinco aves clinicamente saudáveis, do mesmo lote e mesma idade. A necropsia e a coleta das amostras biológicas foram realizadas na própria granja, logo após a contenção física manual para realização da eutanásia por deslocamento cervical. As amostras foram armazenadas em freezer – 80°C até o processamento. Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil – N° 35326.

Preparação das amostras e enriquecimento ácidos nucleicos

Os órgãos (fígado, baço e rins) das aves saudáveis e acometidas pela MD foram processados em pools, contendo órgãos de cinco aves afetadas pela MD e cinco aves saudáveis, constituídos por 30mg de cada órgão e total de 150mg/pool, totalizando seis pools. Cada pool foi então macerado em um cadinho estéril e diluído em PBS (pH 7,2), q.s.p. 3 ml. Os pools foram agitados vigorosamente por cinco minutos em um “vortexer” e clarificados a 4.000 rpm ($\sim 3000 \times g$) durante 30 min a 4 °C. O sobrenadante assim obtido foi filtrado em membrana de 0,45 μ m e centrifugado a 28.000 rpm ($\sim 150,000 \times g$) durante 4h a 4 °C (Sorvall AH629 rotor). Os pellets resultantes foram ressuspensos em água ultrapura e tratados com 2 μ L DNase (2 U/ μ L, Turbo DNase, Ambion), 5 μ L de RNase A (20 mg / mL, Invitrogen) e 0,5 μ L de benzonase (25 U/ μ L, Novagen). Essas misturas foram incubadas a 37 ° C por 2 h para a digestão de ácidos nucleicos não encapsulados (Shan et al., 2011). Uma alíquota de 500 μ l de cada amostra foi utilizada para extração de DNA e RNA. O RNA foi extraído com TRIzol LS (Ambion) e transcrito reversamente para gerar bibliotecas de cDNA com um kit comercial (SeqPlexRNA Amplification Kit; Sigma Aldrich). A extração do DNA foi realizada com fenol-clorofórmio (Sambrook & Russel, 2001) e enriquecido por *multiple displacement amplification* (MDA) com a DNA polimerase do fago ϕ 29 (Dean et al., 2002).

Construção das bibliotecas e sequenciamento

Os ácidos nucleicos enriquecidos aleatoriamente de cada pool original foram misturados em quantidades equimolares (cDNA enriquecido mais DNA enriquecido) e purificados com um kit de limpeza de DNA (*Genomic DNA Clean & Concentrator*; Zymo Research). A qualidade e quantidade das preparações de DNA foram determinadas em um espectrofotômetro L-Quant (Loccus Biotechnology) e em um fluorômetro Qubit HS (Invitrogen). Para o sequenciamento, bibliotecas metagenômicas foram preparadas com 50 ng de DNA (DNA/cDNA), usando-se o kit Nextera XT (Illumina[®]) e seguindo as instruções do fabricante. As bibliotecas foram quantificadas com Bioanalyzer 2000 (Agilent) e o sequenciamento realizado na plataforma Illumina[®]MiSeq usando o kit de reagentes MiSeq Illumina 500v2 (2 \times 250 bases – leituras de seqüências pareadas). O sequenciamento de nucleotídeos foi realizado no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba/PR.

Pipeline de Bioinformática

Análise de qualidade, processamento e análise taxonômica

Uma análise metagenômica foi utilizada para analisar o viroma e bacterioma de órgãos de poedeiras comerciais afetadas pela MD e saudáveis e. A qualidade das sequências geradas foi verificada com o uso do pacote FastQC (Andrews, 2010). As sequências de pares de leitura (*paired-end reads*) com baixa qualidade, com escore de qualidade Phred < 30, foram filtradas com o auxílio do PRINSEQ versão 0.20.4 (Schmieder e Edwards, 2011). As sequências de pares de leitura foram primeiramente mapeadas para o genoma de *Gallus gallus* (UCSC galGal5) pelas ferramentas BWA-MEM (*Burrows-Wheeler Aligner - Maximal Exact Match*) (Li & Durbin, 2010; Li, 2013) e processados com o auxílio do pacote SAMTools (*Sequence Alignment/Map*) (Li, 2011), para remover os contaminantes do hospedeiro. Foi realizada uma classificação taxonômica dos *reads* não mapeados através da ferramenta Centrifuge, um classificador taxonômico de microrganismos a partir de *reads* (Kim et al., 2016). Esta abordagem analisa os *reads* contra a base de dados de sequências não redundantes de nucleotídeos (nt) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (*Nucleotide collection – nt*). As análises de classificação e visualização dos *reads* virais e bacterianos classificados taxonomicamente foram realizadas utilizando a ferramenta Pavian® (Breitwieser & Salzberg, 2016) (Figura 1).

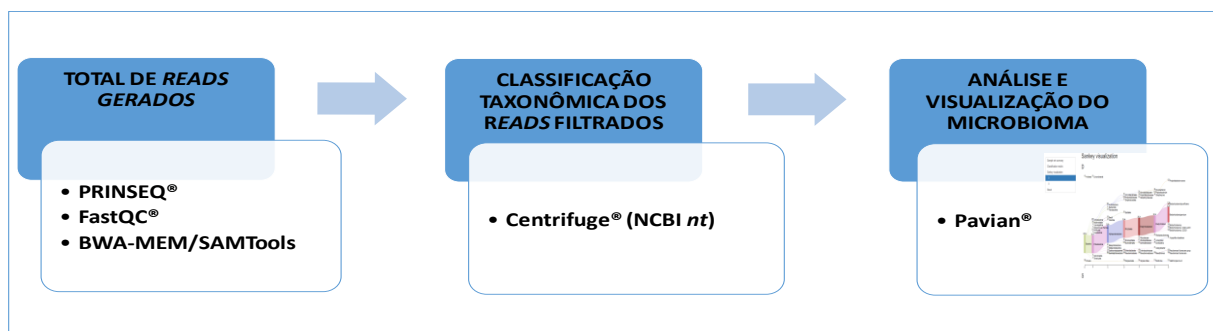


Figura 1. Pipeline de bioinformática utilizado para analisar o microbioma de órgãos de poedeiras comerciais afetadas pela doença de Marek e saudáveis.

Avaliação da abundância viral e bacteriana

Para a análise comparativa do microbioma de órgãos de aves saudáveis e afetadas pela MD, a quantidade de *reads* detectados nas amostras individuais dos pools de cada órgão foram divididas pelo número total de *reads* analisados (Kapusinszky, et al., 2017; Lima, et al.,

2019). Os números de *reads* foram expressos como porcentagens de leituras virais e bacterianas. Na análise do bacterioma, foram consideradas as bactérias de importância em avicultura e saúde pública.

RESULTADOS

Síntese dos dados sequenciados

Um total de 3.482.919 *reads* foram gerados utilizando a plataforma de sequenciamento Miseq. Após os passos de filtragem e excluindo o genoma do hospedeiro (galGal5), o restante de 116.030 pares de *reads*, com uma média de 140 nt, foram utilizados para as análises. Entre os 116.030 pares de *reads* analisados, 68,07% não retornaram resultados (não classificados), 26,08% bactérias, 3,94% eucariotos, 1,78% outras sequências e 0,13% vírus de eucariotos (Figura 2a). A visão dos *reads* classificados, foi demonstrada com o percentual de *reads* em cada grupo (Figura 2b).

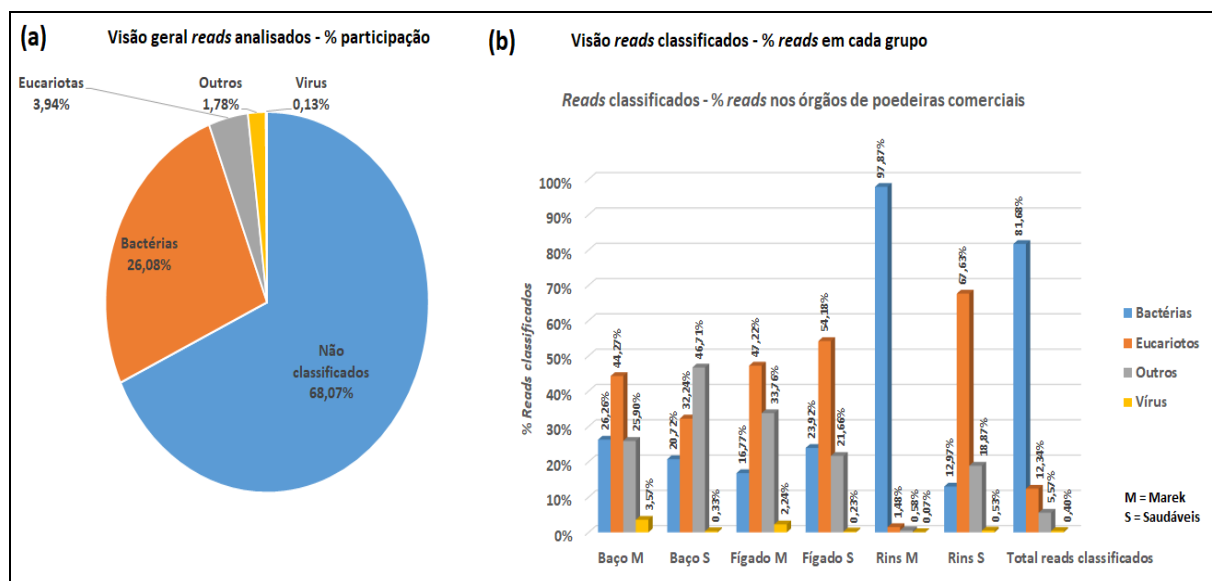


Figura 2. Distribuição dos *reads* obtidos. (a) Total de *reads* analisados (b) *Reads* classificados obtidos a partir de órgãos de aves afetadas pela doença de Marek e saudáveis (% participação em relação aos *reads* classificados).

Análise comparativa do microbioma de aves afetadas pela MD e saudáveis

O total de 116.030 *reads* analisados foram utilizados para a análise comparativa. No grupo das aves afetadas pela MD, de um total de 78.903 *reads* (68%), 39,71% não puderam

ser classificados. Dentre os que puderam ser classificados, 25,47% correspondiam a genomas de bactérias, 1,73% a genomas de eucariotos, 0,99% a outras sequências sem filo definido e 0,11% de sequências correspondendo a vírus de eucariotos. No grupo das aves saudáveis, foram detectados um total de 37.127 *reads* (32%), sendo 28,37% não classificados, 0,61% correspondendo a genomas de bactérias, 2,21% a genomas de eucariotos, 0,79% a outras sequências e 0,02% a genomas de vírus de eucariotos (Figura 3).

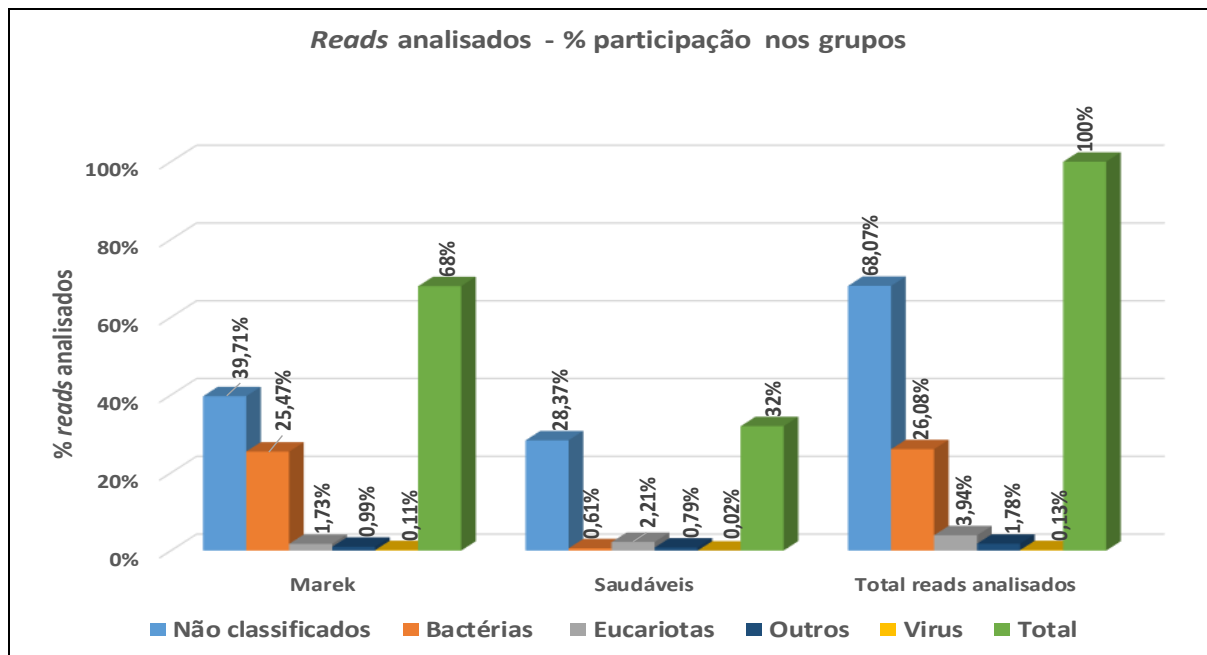


Figura 3. Quantidades relativas de *reads* obtidos nas amostras de órgãos das poedeiras comerciais afetadas pela MD e saudáveis.

Na distribuição taxonômica dos *reads* obtidos para análise do viroma e bacterioma de órgãos de poedeiras comerciais afetadas pela MD (Fig. 4a) e saudáveis (Fig. 4b), foi possível identificar uma interação entre o GaHV-2 e genomas de bactérias patogênicas de importância em saúde pública, como *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* subesp. *enterica* e *Escherichia coli*. O genoma representativo do GaHV-2 foi detectado somente nas aves afetadas pela MD (Figura 4c). Uma maior diversidade de genomas representativos da família *Campylobacteriaceae*, especificamente a espécie *Campylobacter jejuni* foi encontrada nas aves afetadas pela MD com 73,33% e nas saudáveis 26,67% (Figura 4d). Isto também, foi identificado nos genomas representativos da família *Enterobacteriaceae*, pelas espécies *Escherichia coli* com 66,67% nas aves afetadas pela MD e 33,33% nas saudáveis, e a *Salmonella enterica* subesp. *enterica* com 53,33% nas aves afetadas pela MD e 46,67% nas saudáveis (Figura 4e).

Viroma de aves afetadas pela MD e saudáveis

Um total de 0,13% de *reads* de vírus de eucariotos foram atribuídos a genomas de representantes de quatro conhecidas famílias virais; três destas correspondentes a famílias de vírus com genoma de DNA (*Herpesviridae*; 81,3%), *Siphoviridae* (3,6%) e *Myoviridae* (1,4%) e uma família de vírus RNA (*Retroviridae*; 13,7%). Foram detectados 0,11% de *reads* virais nas aves afetadas pela MD (88%) e 0,02% nas aves saudáveis (12%) (Figura 5a). Nas amostras de aves afetadas pela MD, 90% dos *reads* corresponderam a genomas de membros da família *Herpesviridae*, seguida por *Retroviridae* (7%), *Siphoviridae* (2%) e *Myoviridae* (1%). Nas amostras de aves saudáveis, a família viral mais abundantemente representada foi a *Retroviridae* (79%), seguida por *Siphoviridae* (14%) e *Myoviridae* (7%) (Figura 5b).

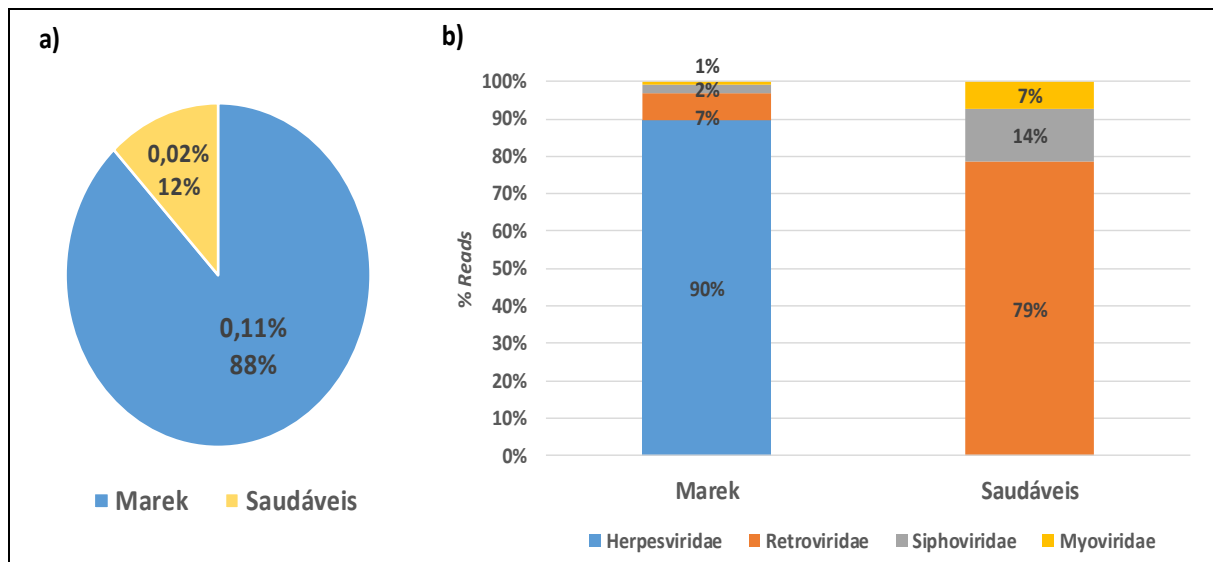


Figura 5. Análise comparativa do viroma de aves saudáveis e afetadas pela MD. a) Percentual de *reads* de vírus de eucariotos e participação em cada grupo. b) Percentual de participação das famílias virais encontradas nas aves afetadas pela MD e nas aves saudáveis.

Os genomas de membros da família *Herpesviridae* foram encontrados no baço, fígado e rins, somente nas aves afetadas pela MD. Por outro lado, genomas de representantes da família *Retroviridae*, foram identificados em todos os órgãos (baço, fígado e rins) de aves saudáveis, bem como no baço e fígado de aves afetadas pela MD. Os genomas de membros da família *Siphoviridae* foram encontrados em fígado e rins de aves saudáveis, e baço e rins de aves afetadas pela MD. Os genomas de representantes da família *Myoviridae* foram detectados somente nos rins de aves saudáveis. A abundância relativa em cada pool de órgãos das aves afetadas pela MD e saudáveis estão demonstradas na Figura 6. O baço das aves

afetadas pela MD foi o órgão com maior participação na abundância de genomas virais com 63%, seguida por rins (14%) e fígado (14%), também das aves afetadas pela MD.

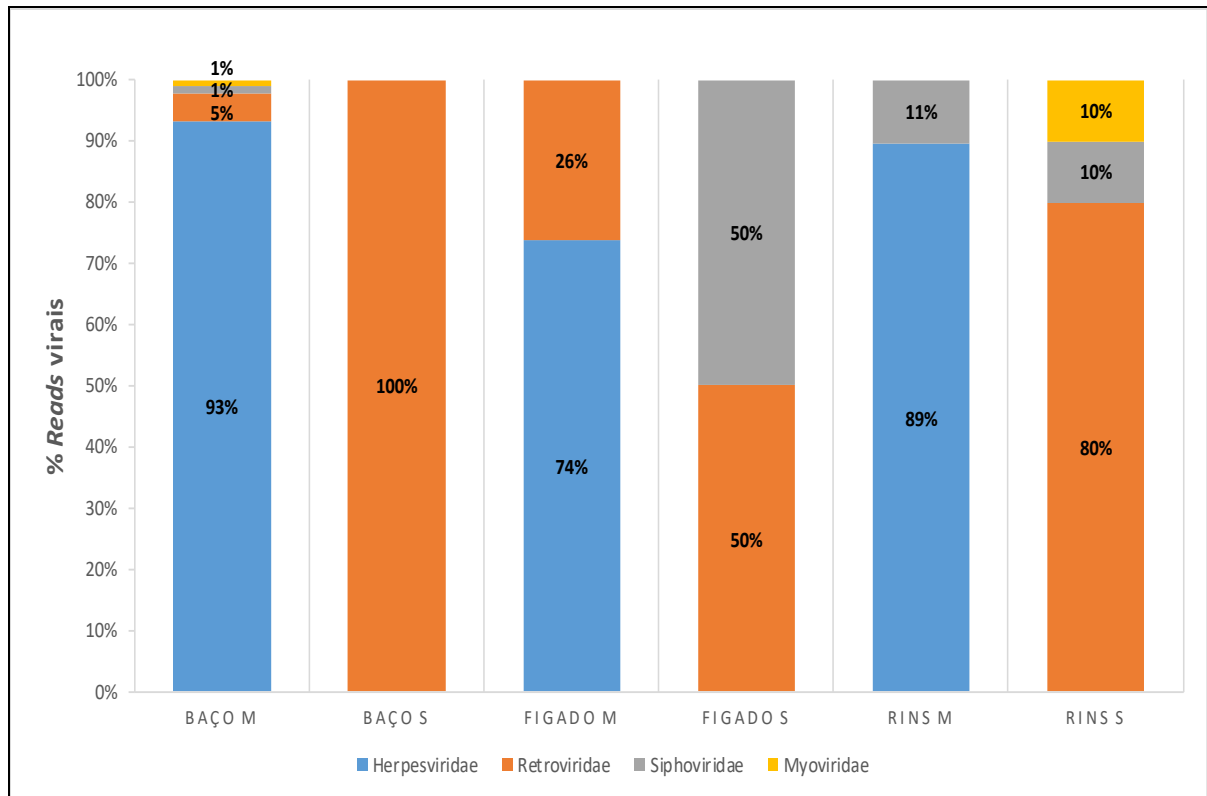


Figura 6: Abundância relativa como percentual de *reads* de genomas representativos das famílias virais encontradas nos diferentes órgãos de aves afetadas pela MD (M) e saudáveis (S).

A seguir é realizado um breve relato dos genomas representativos de membros das famílias virais encontradas nos órgãos de aves afetadas pela MD e de aves saudáveis.

Herpesviridae

A ordem *Herpesvirales* compreende três famílias (*Alloherpesviridae*, *Herpesviridae* e *Malacoherpesviridae*). A família *Herpesviridae*, que é composta por três subfamílias (*Alphaherpesvirinae*, *Gammaherpesvirinae* e *Betaherpesvirinae*) e treze gêneros, possuem uma grande variedade de hospedeiros entre humanos e animais (ICTV, 2019). Neste estudo, em aves afetadas pela MD, 81% do total de *reads* virais corresponderam a genomas do GaHV-2 (NC002229), agente causador da MD. Os dados apresentados demonstram que a presença do GaHV-2 está associada somente a aves afetadas pela MD e não está presente em aves saudáveis do mesmo lote. Não foram encontrados genomas representativos das cepas

vacinais Rispens/CVI988 e HVT/FC 126) com as quais as aves deste estudo haviam sido vacinadas.

Retroviridae

A família *Retroviridae* é composta por duas subfamílias (*Orthoretrovirinae* e *Spumaretrovirinae*), onze gêneros e os membros desta família possuem uma grande variedade de hospedeiros (ICTV, 2019). Genomas representativos de membros da família *Retroviridae* foram identificados em 13,7% do total de reads virais. Estes são correspondentes a um retrovírus endógeno de aves (*avian endogenous retrovirus*; EAV-HP) (NC005947), sendo que tais genomas foram identificados em órgãos de aves saudáveis (7,2%) e afetadas pela MD (6,5%). Elementos virais endógenos representam fragmentos de genomas virais que ao longo do processo evolutivo foram integrados à linha germinal do hospedeiro (Devaney et al., 2016).

Siphoviridae* e *Myoviridae* – Ordem *Caudovirales

A ordem *Caudovirales* compreende bacteriófagos com cauda que infectam bactérias e arqueias, e compreendem as famílias *Siphoviridae*, *Myoviridae* e *Podoviridae* (ICTV, 2019). Genomas representativos de membros da família *Siphoviridae* foram identificados em 3,6% e da *Myoviridae* em 1,4% do total de reads virais. Os genomas representativos de membros da família *Siphoviridae* foram identificados em órgãos de aves saudáveis (1,4%) e afetadas pela MD (2,2%). Os genomas representativos de membros da família *Myoviridae* foram identificados em percentuais iguais, tanto em órgãos de aves saudáveis (0,7%) e afetadas pela MD (0,7%).

Bacterioma de aves afetadas pela MD e saudáveis

O total de 26,08% de *reads* foram atribuídos a genomas de representantes de onze conhecidas famílias de bactérias (*Burkholderiaceae*, *Bacillaceae*, *Campylobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Streptomyetaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Rhodospirillaceae*). A composição microbiana total dos órgãos a nível de genomas representativos das famílias está descrito na Figura 6a. Foram detectados 25,47% nas aves afetadas pela MD e 0,61% nas aves

saudáveis. As espécies de bactérias patogênicas de interesse em saúde pública representaram 0,22% do total de *reads* de bactérias, sendo *Campylobacter jejuni* (0,10%), *Escherichia coli* (0,07%) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (0,05%). A abundância relativa de bactérias patogênicas em cada pool de órgãos das aves afetadas pela MD e saudáveis estão demonstradas na Figura 6b.

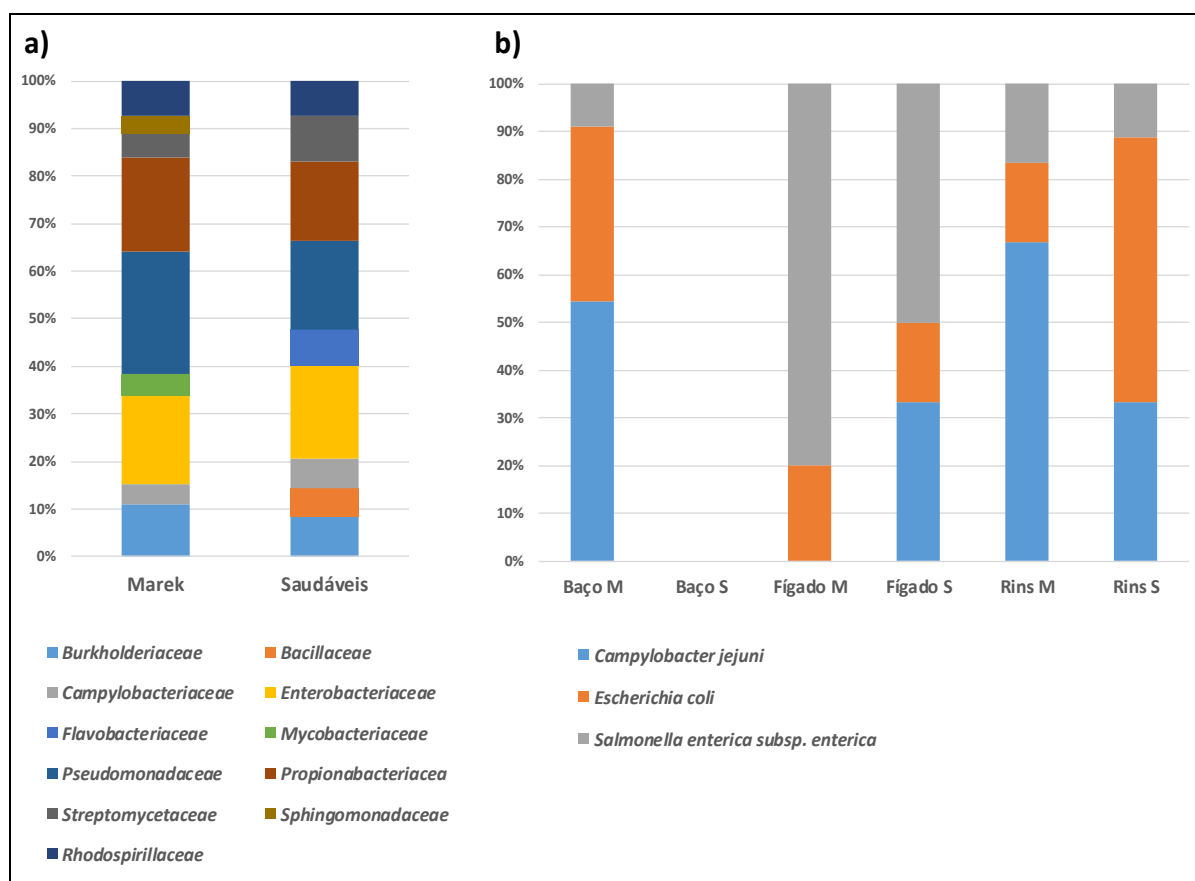


Figura 6: Abundância relativa como percentual de *reads* de genomas representativos da comunidade bacteriana em órgãos de poedeiras comerciais saudáveis e afetadas pela MD. a) Comunidade bacteriana a nível de genomas representativos de famílias. b) Genomas representativos das espécies de bactérias patogênicas nos diferentes órgãos de aves afetadas pela MD (M) e saudáveis (S).

DISCUSSÃO

Neste estudo, uma análise metagenômica foi realizada em órgãos do sistema imune (baço), sistema digestório (fígado) e sistema urinário (rins) de poedeiras comerciais saudáveis e comparado estes achados com os obtidos em aves afetadas pela MD. Diferenças foram encontradas nos genomas representativos de membros das famílias virais e bacterianas em cada grupo. As pesquisas sobre a MD e as infecções do GaHV-2 são focadas na utilização de ferramentas moleculares através das abordagens de PCR e qPCR (Becker et al., 1992, Islam et

al., 2004; Gimeno et al., 2005; Baigent et al., 2016, Puro et al., 2018). Entretanto, novas pesquisas, baseadas no sequenciamento de nova geração, têm sido realizadas para analisar a influência do GaHV-2 na diversidade microbiana e na dinâmica das respostas do hospedeiro à infecção, e tem revelado que o GaHV-2 provoca alterações na população microbiana e que a patogenia e a influência no hospedeiro ainda não são completamente conhecidas (Perumbakkam et al., 2014; Dang et al., 2017).

No controle da MD são utilizadas vacinas vivas com cepas apatogênicas em galinhas (Okazaki et al, 1970; Schat & Calnek, 1978) e cepas patogênicas atenuadas (Rispen et al, 1972), com sucesso desde os anos 70 (Reddy et al, 2016). No entanto, a vacinação não impede a superinfecção, assim, as aves podem ser infectadas simultaneamente com cepas vacinais e patogênicas de GaHV-2 (Gimeno, 2008). Neste estudo, em poedeiras comerciais afetadas pela MD foram identificados genomas representativos de membros de quatro conhecidas famílias virais (*Herpesviridae*, *Retroviridae*, *Shiphoviridae* e *Myoviridae*), sendo que genomas de herpesvírus, especificamente o GaHV-2, foram mais abundantes, como esperado em função da MD, em aves doentes. Em aves saudáveis foram identificados genomas representativos de três famílias virais, sendo que genomas de membros da *Retroviridae* (79%) foram os mais abundantes. Genomas representativos das famílias *Retroviridae*, *Shiphoviridae* e *Myoviridae* foram encontradas em aves saudáveis (Devaney et al., 2016). É esperado que ocorra a infecção de GaHV-2, concomitantemente a infecção de vírus homólogos (ou vacinas vivas contra a DM), e menos frequentemente uma infecção mista com vírus heterólogos, como vírus da Leucose aviário subgrupo J (*avian leukosis virus* subgroup J; ALV-J), vírus da Reticuloendoteliose (*reticuloendotheliosis virus*; REV) e vírus da anemia infecciosa das galinhas (*chicken anemia virus*; CAV) (Zhou et al., 2018). Neste caso, não foram encontrados genomas representativos das cepas vacinais Rispen/CVI988 e HVT/FC 126, com as quais as aves deste estudo haviam sido vacinadas, e também de outros vírus como ALV-J, REV e CAV.

Os membros da família *Enterobacteriaceae*, incluindo patógenos bacterianos zoonóticos como *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Campylobacter* são patógenos entéricos e conforme a virulência da cepa, possuem capacidade de ultrapassar a mucosa intestinal, invadir fagócitos e ativar mecanismos de virulência que permitem sua sobrevivência nos mesmos (Stecher et al., 2010). A migração dos fagócitos infectados para órgãos do sistema reticulo-endotelial, como o baço e fígado, facilita a disseminação da bactéria, desenvolvendo septicemia e podendo levar à morte (Shang, et al., 2018). Neste caso, foi demonstrado uma interação do GaHV-2 sobre a diversidade de genomas representativos das espécies de

bactérias *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* subesp. *enterica* e *Escherichia coli*, espécies bacterianas estas relacionadas a enfermidades em aves e de importância em saúde pública (Marder et al., 2017). Uma maior diversidade de genomas representativos da família *Campylobacteriaceae*, especificamente a espécie *Campylobacter jejuni* foi encontrada nas aves afetadas pela MD com 73,33% e nas saudáveis 26,67%. Isto também, foi identificado nos genomas representativos da família *Enterobacteriaceae*, pelas espécies *Escherichia coli* com 66,67% nas aves afetadas pela MD e 33,33% nas saudáveis, e a *Salmonella enterica* subesp. *enterica* com 53,33% nas aves afetadas pela MD e 46,67% nas saudáveis. Os achados aqui apresentados revelam que a infecção por GaHV-2 em poedeiras comerciais sugere ter favorecido as infecções por bactérias patogênicas, principalmente com *Campylobacter jejuni* e *Escherichia coli*. A infecção citolítica precoce do GaHV-2 está associada a uma imunossupressão que aumenta a susceptibilidade de aves infectadas a outros agentes infecciosos, como *E. coli* ou *Salmonella* (Friedman et al., 1992). As Infecções por vírus imunossupressores podem facilitar a translocação de bactérias como *Salmonella*, *Campylobacter* ou *Escherichia coli* do intestino aos órgãos, o que pode resultar em uma disseminação generalizada (Li et al., 2018). Na avaliação da influência do GaHV-2 em frangos de corte, com amostras de fezes e tonsilas cecais, o vírus imunossupressor modificou a microbiota intestinal (Perumbakkam et al., 2014). Estudos futuros serão necessários para um melhor entendimento da interação entre o GaHV-2 e a diversidade microbiana.

No presente estudo são apresentados dados preliminares sobre as comunidades virais e bacterianas presentes nos órgãos das aves saudáveis e afetadas pela MD. Demonstrada, também a influência do GaHV-2 sobre as infecções por bactérias patogênicas, de interesse em saúde pública, principalmente com *Campylobacter jejuni* e *Escherichia coli*.

Espera-se que esta pesquisa forneça uma linha de base para estudos futuros sobre o GaHV-2 e sobre a sua influência no viroma e bacterioma de aves, buscando contribuir para a determinação da etiologia das doenças onde as interações entre patógenos são ainda pouco examinadas; e identificação de parâmetros para desenvolver melhores medidas de controle e prevenção. Estes resultados também podem auxiliar a compreensão das consequências das doenças imunossupressoras sobre as poedeiras comerciais.

REFERENCIAS

Andrews, S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

Baigent, S. J. Petherbridgea, L.J.; Howesa, K.; Smitha,L.P; Currieb,R.J.W.; Nair, V.K. 2005. Absolute quantitation of Marek's disease virus genome copy number in chicken feather and lymphocyte samples using real-time PCR. *Journal of Virological Methods*. v. 123, p. 53-64.

Baigent, S.J.; Nair, V.K.; Galludec, H.L. 2016. Real-time PCR for differential quantification of CVI988 vaccine virus and virulent strains of Marek's disease virus. *Journal of Virological Methods*, v. 233, p. 23–36.

Becker, Y., Asher, Y., Tabor, E., Davidson, I., Malkinson, M. & Weisman, Y. 1992. Polymerase chain reaction for differentiation between pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDV) and vaccine viruses of MDV-serotypes 2 and 3. *Journal of Virology Methods*, 40, 307-322.

Breitwieser, F.P.; Salzberg, S.L. 2016. Pavian: Interactive analysis of metagenomics data 244 for microbiomics and pathogen identification. *BioRxiv* 084715.

Cui, N.; Huang, X.; Kong, Z.; Huang, Y.; Huang, Q.; Yang, S.; Zhang, L.; Xu, C.; Zhang, X.; Cui, Y. 2018. Newcastle Disease Virus Infection Interferes With the Formation of Intestinal Microflora in Newly Hatched Specific-Pathogen-Free Chicks. *Front. Microbiol.* 9:900. doi: 10.3389/fmicb.2018.00900

Dean, F.B.; Hosono, S.; Fang, L.; Wu, X.; Faruqi, A.F.; Bray-Ward, P.; Sun, Z.; Zong, Q.; Du, Y.; Du, J.; Driscoll, M.; Song, W.; Kingsmore, S.F.; Egholm, M.; Lasken, R.S. 2002. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (8), 5261–5266.

Devaney, R., Trudgett, J., Trudgett, A., Meharg, C., Smyth, V., 2016. A metagenomic comparison of endemic viruses from broiler chickens with runting-stunting syndrome and from normal birds. *Avian Pathol.* 45 (6), 616–629.

Dang, L.; Teng, M.; Li, H-W; Li, H-Z; Ma, S-M; Zhao, P.; Li, Xiu-Jie, Deng, R-G; Zhang, G-P; Luo, J. 2017. Dynamic Changes in the Splenic Transcriptome of Chickens during the Early Infection and Progress of Marek's Disease. *Scientific Reports*. 7: 11648 |

DOI:10.1038/s41598-017-11304-y

Denesvre, C.; Dumarest, M, Remy, S; Gourichon, D.; Marc, E. Chicken skin virome analyzed by high-throughput sequencing shows a composition highly different from human skin. *Virus Genes* 2015;51:209–16.

Friedman, A.; Shalem-Meilin, E.; Heller, E.D. 1992. Marek's disease vaccines cause temporary B-lymphocyte dysfunction and reduced resistance to infection in chicks. *Avian Pathol* 21:621–631.

Gennart, I.; Coupeau, D.; Pejakovic, S.; Laurent, S.; Rasschaert, D.; Muylkens, B. 2015. Marek's disease: Genetic regulation of *gallid herpesvirus 2* infection and latency. *The Veterinary Journal*,(3), 339-348.

Gimeno, I. M.; Witter, R. L.; Fadly, A. M.; Silva, R. F. 2005. Novel criteria for the diagnosis of Marek's disease virus-induced lymphomas. *Avian Pathol*. 34:332–340.

Gimeno, I.M. 2008. Marek's disease vaccines: a solution for today but a worry for tomorrow. *Vaccine* 26 (Suppl. (3)), C31–41.

Guo, Y.; Li, S.; Sun, X.; He, Y.; Zhao, H.; Wang, Y.; Zhao, P.; Xing, M. 2017. Complete genome sequence and evolution analysis of a columbid herpesvirus type 1 from feral pigeon in China. *Arch Virol*.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2015. Disponível em:

<https://talk.ictvonline.org/ictvreports/ictv_9th_report/dsdnaviruses2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae. Acesso em: 16 de maio de 2017.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2019. Disponível em:

<https://talk.ictvonline.org/ictvreports/ictv_9th_report/dsdnaviruses2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae. Acesso em: 05 de março de 2019

Islam, A., Harrison, B., Cheetham, B.F., Mahony, T.J., Young, P.L., Walkden-Brown, S.W., 2004. Differential amplification and quantitation of Marek's disease viruses using real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 119, 103–113.

Kapusinszky, B.; Ardeshir, A.; Mulvaney, U.; Deng, X.; Delwart, E., 2017. Case-control comparison of enteric viromes in captive Rhesus macaques with acute or idiopathic chronic diarrhea. *J. Virol.* 91 (18).

Li, L.; Kubasova, Â. T.; Rychlik, I.; Hoerr, F.J.; Rautenschlein, S. 2018. Infectious bursal disease virus infection leads to changes in the gut associated-lymphoid tissue and the microbiota composition. *PLoS ONE* 13(2): e0192066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192066>.

Li, H.; Durbin, R. 2010. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics.* Mar 1;26(5):589-95.

Li, H. 2011. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics.* Nov 1;27 (21):2987-93.

Li, H. 2013. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. Oxford University Press. Vol. 00 no. 00, pag.1-3.

Lima, D.A.; Cibulskib, S. P.; Tochetto, C.; Varela, A.P.M; Finklera, F., Teixeira, T. F.; Loiko, M.R., Cervac, C.; Junqueira, D.M.; Mayerc, F. Q.; Roehe, P.M.. 2019. The intestinal virome of malabsorption syndrome-affected and unaffected broilers through shotgun metagenomics. *Virus Research* 261 (2019) 9–20.

Lu, J.; Breitwieser, F.P.; Thielen, P.; Salzberg, S.L. 2017. Bracken: estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Comput. Sci.* 3:e104; DOI10.7717/peerj-cs.104.

Marder, E.P.; Cieslak, P.R.; Cronquist, A.B., Dunn, J., Lathrop, S., Rabatsky-Ehr, T., Ryan, P., Smith, K., Tobin-D'Angelo, M., Vugia, D.J., Zansky, J., Holt, K., Wolpert, B.J., Lynch, M., Tauxe, R., Geissler, A.L. Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted

Commonly Through Food and the Effect of Increasing Use of Culture-Independent Diagnostic Tests on Surveillance — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2013–2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2017;66:397–403.

Mete, A., Gharpure, R., Pitesky, M.E., Famini, D., Sverlow, K. & Dunn, J. 2016. Marek's disease in backyard chickens, a study of pathologic findings and viral loads in tumorous and nontumorous birds. *Avian Diseases*, 60, 826–836.

McPherson, M. C.; Delany, M. E. 2016. Virus and host genomic, molecular, and cellular interactions during Marek's disease pathogenesis and oncogenesis. *Poultry Science* 00:1–18.

Mikheenko, A.; Saveliev, V.; Gurevich, A. A. MetaQUAST: evaluation of metagenome assemblies. *Bioinformatics* 32(7): 1088-1090 (2016).

Niemeyer, C.; Favero, C.M.; Shivaprasad H.L.; Uhart, M.; Musso, C.M.; Rago, M.V., et al.. 2017. Genetically diverse herpesviruses in South American Atlantic coast seabirds. *PLoS ONE* 12(6): e0178811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178811>

Okazaki, W.; Purchase, H.G.; Burmester, B.R. 1970. Protection against Marek's disease by vaccination with a herpesvirus of turkeys. *Avian Dis.* 14, 413–429.

Ondov, B.D.; Bergman, N.H.; Phillippy, A.M. 2011. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics* 12:385.

Osterrieder, N.; Kamil, J.P.; Schumacher, D.; Tischer, B.K.; Trapp, S. 2006. Marek's disease virus: from miasma to model. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 283–294

Perumbakkam, S.; Hunt, H.D.; Cheng, H.H. 2014. Marek's disease virus influences the core gut microbiome of the chicken during the early and late phases of viral replication. *FEMS Microbiol Ecol.* 90(1):300±12. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12392> PMID: 25065611.

Puro, K.U.; Bhattacharjee, U.; Baruah, S.; Sen, A.; Das, S.; Ghatak, S.; Doley, S.; Sanjukta, R.; Shakuntala, I. 2018. Characterization of Marek's disease virus and phylogenetic analyses of meq gene from an outbreak in poultry in Meghalaya of Northeast India. *VirusDisease*, Jun; 29(2):167-172.

Qiu, Y.; Wang, S.; Huang, B., Zhong, H., Pan, Z.; Zhuang, Q, et al. 2019. Viral infection detection using metagenomics technology in six poultry farms of eastern China. PLoS ONE 14(2): e0211553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211553>.

Romero-Espinoza, J.A.; Moreno-Valencia, Y.; Coronel-Tellez, R.H.; Castillejos-Lopez, M.; Hernandez, A.; Dominguez, A. et al. 2018. Virome and bacteriome characterization of children with pneumonia and asthma in Mexico City during winter seasons 2014 and 2015. PLoS ONE 13(2):e0192878. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192878>

Reddy, S.M.; Izumiyab, Y., Lupiani, B. 2016. Marek's Disease Vaccines: Current Status, and Strategies for Improvement and Development of Vector Vaccines. Veterinary Microbiology. In press. Nov 24.

Sambrook, J.; Russel, D. W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Press.

Shan, T., Li, L., Simmonds, P., Wang, C., Moeser, A., Delwart, E., 2011. The fecal viroma of pigs on a high-density farm. J. Virol. 85 (22), 11697–11708.

Schat, K.A.; Calnek, B.W. 1978. Characterization of an apparently nononcogenic Marek's disease virus. J. Natl. Cancer Inst. 60, 1075–1082.

Schmieder, R., Edwards, R., 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. Bioinformatics 27 (6), 863–864.

Shang, Y., Kumar, S., Oakley, B; Kim, W.K. 2018. Chicken Gut Microbiota: Importance and Detection Technology. Front. Vet. Sci. 5:254.doi: 10.3389/fvets.2018.00254.

Simon, C.; Daniel, R. 2011. Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. Applied and Environmental Microbiology, v.77, n.4, p. 115-1161, 15 fev.

Stecher, B.; Chaffron, S.; Kappeli, R.; Hapfelmeier, S.; Friedrich, S.; Weber, T.C. et al. 2010. Like will to like: abundances of closely related species can predict susceptibility to intestinal

colonization by pathogenic and commensal bacteria. PLoS Pathog 6(1):e1000711. doi:10.1371/journal.ppat.1000711.

Witter, R. L.; Schat, K. A. 2003. Neoplastic diseases: Marek's disease. In: SAIF, Y. M., BARNES, H. J., FADLY, A. M., GLISSON, J. R., MCDUGALD, L. R.; SWAYNE, D.E. (Eds). Diseases of poultry. 11th ed. Ames: Iowa State University. p. 407-465.

Witter, R.L., Fadly, A.M. Reticuloendotheliosis. 2003. In: Diseases of poultry, 11ed. Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., McDougald, L.R., Swayne, D.E. (eds). Ames, Iowa: Blackwell Publishing Company. pp. 517-536, 2003.

Witter, R.L.; Calnek, B.W.; Buscaglia, C.; Gimeno, I.M.; Schat, K.A. 2005. Classification of Marek's disease viruses according to pathotype: philosophy and methodology. Avian Pathol. 34, 75-90.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foi relatado um surto esporádico da MD em poedeiras comerciais vacinadas com as cepas Rispens/CVI988 e HVT/FC-126, no sul do Brasil, através dos achados epidemiológicos, clínicos, patológicos e moleculares. Adicionalmente, foram apresentados dados preliminares sobre as comunidades virais e bacterianas presentes nos órgãos das aves saudáveis e afetadas pela MD, com a respectiva influência do GaHV-2 sobre as infecções por bactérias patogênicas, de interesse em saúde pública, principalmente como *Campylobacter jejuni* e *Escherichia coli*.

A maior frequência de relatos de surtos da MD em poedeiras comerciais e matrizes pesadas é importante para que possam ser realizadas as análises de todas as possíveis causas, sejam estas, relacionadas aos processos de biossegurança e vacinação, ou associados a evolução das cepas de GaHV-2. Um maior número de casos é necessário para um estudo da evolução do MDV e sua relação como a superação da imunidade das vacinas, e também uma investigação mais aprofundada que contemple a análise da frequência dos casos, a genética do hospedeiro, tempo de duração da criação, densidades de alojamento, sistemas de produção, qualidade das vacinas e fabricantes, estratégias de vacinação e procedimentos de biossegurança.

Vacinação e acompanhamento do processo, monitoria precoce da eficácia das vacinas por qPCR, além de um programa rígido de biossegurança, treinamentos periódicos dos funcionários, são as ferramentas mais eficazes em termos de eficácia e custos para prevenir a MD. Além disso, podemos incluir o sequenciamento de nova geração, com o apoio da bioinformática, para estudar as interações de vírus imunossupressores como o GaHV-2 sobre o microbioma das aves.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afonso, C. L., E. R. Tulman, Z. Lu, L. Zsak, D. L. Rock, and G. F. Kutish. 2001. The genome of turkey herpesvirus. *Journal of Virology* 75:971–978.

Allen T.C. 1992. Hematoxylin and Eosin, p.53–58. In: Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B. & Sobin L.H. (ed.) *Laboratory Methods in Histotechnology*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC.279 p.

Aly, M. M., Smith, E. J., and Fadly, A. M. 1993. Detection of reticuloendotheliosis virus infection using the polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 22: 543-554.

Arulmozhi, A., S. Saravanan, B. Mohan, and G. A. Balasubramaniam. An outbreak of Marek's disease in desi chicken. *Indian Vet. J.* 89:122–123. 2012.

Baaten, B. J. G.; Butter, C.; Davison, T. F. 2004. Study of host-pathogen interactions to identify sustainable vaccine strategies to Marek's disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 100, p. 165-177.

Baigent, S. J et al. Absolute quantitation of Marek's disease virus genome copy number in chicken feather and lymphocyte samples using real-time PCR. *Journal of Virological Methods*. v. 123, p. 53-64, 2005

Baigent, S.J.; Nair, V.K.; Galludec, H.L. 2016. Real-time PCR for differential quantification of CVI988 vaccine virus and virulent strains of Marek's disease virus. *Journal of Virological Methods*, v. 233, p. 23–36.

Becker, Y., Asher, Y., Tabor, E., Davidson, I., Malkinson, M. & Weisman, Y. (1992). Polymerase chain reaction for differentiation between pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDV) and vaccine viruses of MDV-serotypes 2 and 3. *Journal of Virology Methods*, 40, 307-322.

Biggs, P.M.; Nair, V. 2012. The long view: 40 years of Marek's disease research and avian pathology. *Avian Pathol.* 41:3–9.

Blomstrom, A. L.; Widen, F., Hammer, A. S.; Belak, S.; Berg, M. 2010. Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *J Clin Microbiol* 48(12): 4392-4396.

Boodhoo, N.; Gurung, A.; Sharif, S.; Behboudiet, S. 2016. *Veterinary Research*. 47:119

Boom, R.; Sol, C.J.A.; Salimans, M.M.M.; Jansen, C.L.; Wertheim-van Dillen, P.M.E.; Van der Noordaa, J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 28, 495-503.

BRASIL (2006) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 7, de 10 de março de 2006. Dispõe sobre o Regulamento técnico para a produção, o controle e

o emprego de vacinas, antígenos e diluentes para uso na avicultura. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 20 de março de 2006. Disponível em: <<http://agricultura.gov.br>>. Acesso em: 15 de julho de 2016.

Buscaglia, C., P. Nervi, and M. Risso. Characterization of four very virulent Argentinian strains of Marek's disease virus and the influence of one of those isolates on synergism between Marek's disease vaccine viruses. *Avian Pathol.* 33:190–195. 2004

Buscaglia, C. 2013. Mixed Infections of Marek's Disease and Reticuloendotheliosis Viruses in Layer Flocks in Argentina. *Avian Diseases* 57(2s1):569-571.

Canal, C. W.; Barbosa, T. M. 2009. Enfermidade de Marek, complexo leucótico aviário e reticuloendoteliose. In: Berchieri Junior, A.; Silva, E. N.; Di Fábio, J.; Sesti, L.; Zuanaze, M. A. F. Doença das aves. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia avícolas, cap. 5, p. 569-586.

Calnek, B. W.; Witter, R. L. 1985. Marek's disease - a model for herpesvirus oncology. *Crit. Rev. Microbiol.*, 12:293-320.

Cao, W., J. Mays, and J. Dunn. Use of polymerase chain reaction in detection of Marek's disease and reticuloendotheliosis viruses in formalin- fixed, paraffin-embedded tumorous tissues. *Avian Dis.* 57:785–789. 2013.

Cebrian, J., Kaschka-Dierich, C., Berthelot, N.; Sheldrick, P. 1982. Inverted repeat nucleotide sequences in the genomes of Marek disease virus and the herpesvirus of the turkey. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 79, 555–558.

CEESA. 2016. Executive Animal Health Study Center (Central and Eastern European Schools Association). Disponível em: www.ceesa.be. Acesso em: fevereiro de 2017.

Churchill, A. E.; Payne, L. N.; Chubb, R. C. 1969. Immunization against Marek's disease using a live attenuated virus. *Nature*, 221:744–7.

Coffin, J.M. 1992. Structure and Classification of Retroviruses. In J. A. Levy, (Ed). *The Retroviridae*, vol. 1 (pp. 19– 49). New York: Plenum Press.

Cui,N.; Su,S.; Sun,P.; Zhang,Y.; Han,N.; Cui,Z. 2016. Isolation and pathogenic analysis of virulent Marek's disease virus field strain in China. *Poultry Science* 95, 1521-1528.

Cui, N.; 1, 2, Li, X.; Chen, C., Hao, H.; Su, Shuai, Cui, Z. 2016. Transcriptional and Bioinformatic Analysis Provide a Relationship between Host Response Changes to Marek's Disease Viruses Infection and an Integrated Long Terminal Repeat. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6:46.

Davidson, I., A. Borowsky, S. Perl, and M. Malkinson. 1995. Use of the PCR for the diagnosis of natural infection of chickens and turkeys with Marek's disease virus and reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathol.* 24: 69-94.

Digiaco, R.F. & T.D. Koepsell. Sampling for detection of infection of disease in a animal population. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 189:22-23, 1986.; MARTIN, S.W.; A.H. MEEK & P. WILLEBERG. *Veterinary Epidemiology: principles and methods*, 2ed. Iowa State University Press, Ames Iowa, USA. 1988.

Dunn, J.R.; Gimeno, I.M., 2013. Current status of Marek's disease in the United States and worldwide based on a questionnaire survey. *Avian Diseases.* 57, 483–490.

Dunn, J.R., Black Pyrkosz, A. & Cheng, H.H. 2016. Pathotyping of current Marek's disease virus field strains and identification of sequence variants to predict virulence. In M. Bublot, C. Denesvre & J.-F. Vautherot (Eds.), *11th International Symposium on Marek's disease and Avian Herpesvirus* (p. 10). Tours, France: INRA.

Ewert, D.L., DeBoer, G.F. 1988. Avian lymphoid leukosis: Mechanism of lymphomagenesis. In: K. Perk (ed), *Immunodeficiency Disorders* (pp. 37– 53). Boston: Academic Press, Inc.

Fadly, A. M., Venugopal, K. 2008. Leukosis/sarcoma group, p 514 –568. In Saif YM, et al (ed), *Diseases of poultry*, 12th ed. Iowa State Press, Ames, IA.

Faiz, N. M.; Cortes, A.L.; Guy, J.S.; Fogle, J.E.; Gimeno, I.M. 2016. Efficacy of various Marek's disease vaccines protocols for prevention of Marek's disease virus-induced immunosuppression. *Vaccine.*

Faiz, N. M.; Cortes, A.L.; Guy, J.S.; Fletcher, O.J.; Cimino, T.; Gimeno, I. M. 2017. Evaluation of factors influencing the development of late Marek's disease virus-induced immunosuppression: virus pathotype and host sex. *Avian Pathology.*

Franco, A.C.; ROEHE, P.M., VARELA, A.P.M. 2012. Herpesviridae, In: FLORES, E.F., *Virologia. Veterinária, Santa Maria - RS, Ed. Da UFSM, cap.18, p.503-570.*

Frey, K.G; Herrera-Galeano, J.E.; Redden, C.L.; Luu, T.V.; Servetas, S.L.; Mateczun, A.J.; Mokashi, V.P.; Bishop-Lilly, K.A. Comparison of three next-generation sequencing platforms for metagenomic sequencing and identification of pathogens in blood. *BMC Genomics.* 2014.Feb 4;15:96.

Garcia M., J. El-Attrache, S. M. Riblet, V. R. Lunge, A. S. K. Fonseca, P. Villegas, and N. Ikuta. Development and application of reverse transcriptase nested polymerase chain reaction test for the detection of exogenous avian leukosis virus. *Avian Dis.* 47:41–53. 2003.

Gennart, I.; Coupeau, D.; Pejakovic, S.; Laurent, S.; Rasschaert, D.; Muylkens, B. 2015. Marek's disease: Genetic regulation of gallid herpesvirus 2 infection and latency. *The Veterinary Journal*,(3), 339-348.

Geoghegan, J.L.; Holmes, E.C. The phylogenomics of evolving virus virulence. *Nature Reviews*. 2018. Vol.19, 756-769.

Gimeno, I. M., R. L. Witter, A. M. Fadly, and R. F. Silva. Novel criteria for the diagnosis of Marek's disease virus-induced lymphomas. *Avian Pathol.* 34:332–340. 2005.

Gimeno, I.M. 2008. Marek's disease vaccines: a solution for today but a worry for tomorrow. *Vaccine* 26 (Suppl. (3)), C31–41.

Gimeno, I.M.; Cortes, A. L.; Montiel, E.R.; Lemiere, S.; Pandiri, A.K. R. 2011. Effect of Diluting Marek's Disease Vaccines on the Outcomes of Marek's Disease Virus Infection When Challenged with Highly Virulent Marek's Disease Viruses. *Avian Diseases Digest: Vol. 6, No. 2*, pp. e17-e18.

Gimeno, I.M.; Pandiri, A.R. 2013. Virus-induced immunosuppression: Marek's disease virus infection and associated syndromes. In: Gimeno IM, editor. *Immunosuppressive diseases of poultry Zaragoza. Servet-Group Asis*; p.124–152.

Gopal, S, Manoharan, P., Kathaperumal, K., Chidambaram, B., Divya, K.C. 2012. Differential detection of avian oncogenic viruses in poultry layer farms and turkeys by use of multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2668–673

Gong, Z., L. Zhang, J. Wang, L. Chen, H. Shan, Z. Wang, and H. Ma. Isolation and analysis of a very virulent Marek's disease virus strain in China. *Virol. J.* 10:155. 2013.

Guo, Y.; Li, S.; Sun, X.; He, Y.; Zhao, H.; Wang, Y.; Zhao, P.; Xing, M. 2017. Complete genome sequence and evolution analysis of a columbid herpesvirus type 1 from feral pigeon in China. *Arch Virol.*

Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol.* 1998 Oct;5(10):R245

Hassanin, O., AbdallaH, F., Iman, E. & El-Araby, I.E. 2013. Molecular characterization and phylogenetic analysis of Marek's Disease Virus from clinical cases of Marek's Disease in Egypt. *Avian Diseases*, 57: 555–561.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2015. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictvreports/ictv_9th_report/dsdnaviruses2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae>. Acesso em: 16 de maio de 2017.

Islam, A., Harrison, B., Cheetham, B.F., Mahony, T.J., Young, P.L., Walkden-Brown, S.W., 2004. Differential amplification and quantitation of Marek's disease viruses using real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 119, 103–113.

Islam A., Cheetham B.F., Mahony T.J., Young P.L., Walkden-Brown S.W. 2006. Absolute quantitation of Marek's disease virus and Herpesvirus of turkeys in chicken lymphocyte, feather tip and dust samples using real-time PCR. *J. Virol. Methods.* 132:127–134.

Izumiya, Y., H. K. Jang, M. Ono, and T. Mikami. 2001. A complete genomic DNA sequence of Marek's disease virus type 2, strain HPRS24. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 255:191–221.

Geoghegan, J.; Holmes, E. 2018. The phylogenomics of evolving virus virulence. *Nature Reviews Genetics.* 19 (12):756-769.

Gennart, I.; Coupeau, D.; Pejakovic, S.; Laurent, S.; Rasschaert, D.; Muylkens, B. 2016. Marek's disease: Genetic regulation of gallid herpesvirus 2 infection and latency, *The Veterinary Journal* (2015), doi: 10.1016/j.tvjl.2015.04.038.

Kennedy, D.A.; Dunn, J.R.; Dunn, P.A.; Read, A.F. 2015. An observational study of the temporal and spatial patterns of Marek's-disease-associated leukosis condemnation of young chickens in the United States of America. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 120, 328–335.

Kingham, B.F., Zelnik, V., Kopacek, J., Majerciak, V., Schmidt, C.J., 2001. The genome of herpes virus of turkeys: comparative analysis with Marek's disease viruses. *J. Gen. Virol.* 82, 1123–1135.

Kung, H.-J., Xia, L., Brunovskis, P., Li, D., Liu, J.-L., Lee, L.F., 2001. Meq: an MDV specific bZIP transactivator with transforming properties. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 255, 245–259.

Landman, W. J.; Verschuren, S. B. 2003. Titration of Marek's disease cell-associated vaccine virus (CVI 988) of reconstituted vaccine and vaccine ampoules from Dutch hatcheries. *Avian Dis.* 47:1458–1465.

Lee, L. F.; Wu, P.; Sui, D.; Ren, D.; Kamil, J.; Kung, H. J.; Witter, R. L. 2000. The complete unique long sequence and the overall genomic organization of the GA strain of Marek's disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:6091–6096.

Lin, J.A.; Chen, C.P. 1996. First isolation and characterization of very virulent Marek's disease virus in Taiwan. *J. Wet MedSci* 58:1011–1015.

Lobago, F.; Woldemeskel, M. 2004. An outbreak of Marek's disease in chickens in central Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.* 36:397–406.

López-Osorio, S.; Piedrahita, D.; Espinal-Restrepo, M.A.; Ramírez-Nieto, G.C.; Nair, V.; Williams, S.M.; Baigent, S.; Ventura-Polite, C.; Aranzazu-Taborda, D.A.; Chaparro-Gutiérrez, J.J. 2017. Molecular characterization of Marek's disease virus in a poultry layer farm from Colombia. *Poultry Science* 0:1–11.

Lupiani, B., L. F. Lee, X. Cui, I. Gimeno, A. Anderson, R. W. Morgan, R. F. Silva, R. L. Witter, H. J. Kung, and S. M. Reddy. 2004. Marek's disease virus-encoded Meq gene is involved in transformation of lymphocytes but is dispensable for replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:11815–11820.

Marek, J. 1907. Multiple nervenentzündung (polyneuritis) bei hühnern. *Dtsch TierarztlWochenschr*;15:417–21.

Mete, A.; Gharpure, R.; Pitesky, M. E.; Famini, D.; Sverlow, K.; Dunn, J. 2016. Marek's Disease in Backyard Chickens, A Study of Pathologic Findings and Viral Loads in Tumorous and Nontumorous Birds. *Avian Diseases*, 60(4):826-836.

McPherson, M. C.; Delany, M. E. 2016. Virus and host genomic, molecular, and cellular interactions during Marek's disease pathogenesis and oncogenesis. *Poultry Science* 00:1–18.

Mohamed, M. H. A.; El-Sabagh, I.M.; Al-Habeeb, M.A.; Al-Hammady, Y.M. 2016. Diversity of Meq gene from clinical Marek's disease virus infection in Saudi Arabia. *Veterinary World*, 9(6): 572-578.

Morrow, C., and F. Fehler. Marek's disease: a worldwide problem. In: *Marek's disease: an evolving problem*. T. F. Davison and V. K. Nair, eds. Elsevier Academic Press, London, England. pp. 49–61. 2004.

Murphy, F. A.; Gibbs, E. P. J.; Horzinek, M. C. et al. 1999. *Circoviridae*. *Veterinary Virology*. 3. Ed. San Diego, California: Academic Press Editora. p.357–362.

Nair V. Evolution of Marek's disease – a paradigm for incessant race between the pathogen and the host. *Vet. J.* 2005;170:175–183.

Nooij, S.; Schmitz, D.; Vennema, H.; Kroneman, A. and Koopmans, M.P.G. 2018. Overview of Virus Metagenomic Classification Methods and Their Biological Applications. *Front. Microbiol.* 9:749. doi: 10.3389/fmicb.2018.00749

Okazaki, W.; Purchase, H.G.; Burmester, B.R. 1970. Protection against Marek's disease by vaccination with a herpesvirus of turkeys. *Avian Dis.* 14, 413–429.

Okonkwo, C. 2015. An Outbreak of Marek's Disease in Adult Layer Chickens in Umuahia, Abia State, Nigeria. *Annual Research & Review in Biology*, 7(3): 200-205.

Osterrieder, N.; Kamil, J.P.; Schumacher, D.; Tischer, B.K.; Trapp, S. 2006. Marek's disease virus: from miasma to model. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 283–294.

Pappenheimer, A.M.; Dunn, L.C.; Cone, V. 1926. A study of fowl paralysis: neurolymphomatosis gallinarum. *Storrs Agric Exp Stn*;143:187–290.

- Pappenheimer, A. W.; Dunn, L. C.; Cone, V. 1929. Studies on fowl paralysis (Neurolymphomatosis gallinarum). I. Clinical features and pathology. *J. Exp. Med.* 46, 63–86.
- Payne LN, Biggs PM (1967). Studies on Marek's disease. II. Pathogenesis. *J Natl Cancer Inst* 39: 281-302.
- Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B. & Sobin L.H. 1992. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC. 279 p.
- Raja, A., Dhinakar Raj, G., Bhuvanewari, P., Balachandran, C. & Kumanan, K.. 2009. Detection of virulent Marek's disease virus in poultry in India. *Acta Virologica*, 53: 255–260.
- Ralapanawe, S.; Walkden-Brown, S.W.; Islam, A.F.M. F.; Renz, K.G., 2016. Effects of Rispens CVI988 vaccination followed by challenge with Marek's disease viruses of differing virulence on the replication kinetics and shedding of the vaccine and challenge viruses. *Veterinary Microbiology*. 183, 21–29.
- Ramos-Vara, J.A. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet. Pathol.*, v.42, n.4, p.405-426.
- Read, A.F.; Baigent, S.J.; Powers, C.; Kgosana, L.B.; Blackwell, L.; Smith, L.P.; Kennedy, D.A.; Walkden-Brown, S.W.; Nair, V.K. 2015. Imperfect vaccination can enhance the transmission of highly virulent pathogens. *PLoS Biol.* 13 (7).
- Reddy, S.M., Lupiani, B., Gimeno, I.M., Silva, R.F., Lee, L.F. & Witter, R.L. (2002). Rescue of a pathogenic Marek's disease virus with overlapping cosmid DNAs: use of a pp38 mutant to validate the technology for the study of gene function. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 99, 70547059.
- Reddy, S.M.; Izumiyab, Y., Lupiani, B. 2016. Marek's Disease Vaccines: Current Status, and Strategies for Improvement and Development of Vector Vaccines. *Veterinary Microbiology*. *In press*. Nov 24.
- Renz, K., Cooke, J., Cheetham, B., Hussain, Z., Islam, A., Tannock, G. and Brown, S.. 2012. Pathotyping of Australian isolates of Marek's disease virus and association of pathogenicity with MEQ gene polymorphism. *Avian Pathology*, 41: 161-176.
- Renz K.G., Islam A., Cheetham B.F., Walkden-Brown S.W. 2006. Absolute quantification using real-time polymerase chain reaction of Marek's disease virus serotype 2 in field dust samples, feather tips and spleens. *J. Virol. Methods*. 135:186–191.
- Rispens, B.H.; Van Vloten, J.; Mastenbroek, N.; Maas, H.J.L.; Schat, K.A. 1972. Control of Marek's disease in the Netherlands. I. Isolation of an avirulent Marek's disease virus (strain CVI 988) and its use in laboratory vaccination trials. *Avian Dis.* 16, 108–125.

Roizman, B.; Knipe, D.M.; Whitley, R.J. 2007. Herpes Simplex Viruses. In: *Fields Virology*, Editors Knipe, David M.; Howley, Peter M. 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, p. 2502-2601.

Sambrook, J.; Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Press, 2001.

Schat, K.A.; Calnek, B.W. 1978. Characterization of an apparently nononcogenic Marek's disease virus. *J. Natl. Cancer Inst.* 60, 1075–1082.

Schat, K. 1987. Marek's disease: a model for protection against herpesvirus-induced tumors. *Cancer Surv.*, 6:1-5.

Schat, K.A.; Purchase, H.G. 1998. Cell-culture methods. In D.E. Swayne, J.R. Glisson, M.W. Jackwood, J.E. Pearson & W.M. Reed (Eds.), *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 4th edn (pp. 223/234). Kennett Square, PA: American Association of Avian Pathologists.

Schat, K. A.; Xing, Z. 2000. Specific and nonspecific immune responses to Marek's disease virus. *Dev. Comp. Immunol.*, 24:201-221.

Schat, K.A., Nair, V. 2008. Marek's disease. In: *Diseases of Poultry*, Twelfth Edition, Saif Y.M. et al., eds. Blackwell Publishing, Ames Iowa, USA, 452-514.

Sharma, J. M. 1998. Marek's disease. In D. E. Swayne, J. R. Glisson, M. W. Jackwood, J. E. Pearson, and W. M. Reed (eds.). *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*, 4th ed. American Association of Avian Pathologists: Kennett Square, PA, 116-124.

Silva, R.F. 1992. Differentiation of pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDVs) by the polymerase chain reaction amplification of the tandem direct repeats within the MDV genome. *Avian Dis.* 36, 521–528.

Spatz, S. J.; Petherbridge, L.; Zhao, Y.; Nair, V. 2007. Comparative full-length sequence analysis of oncogenic and vaccine (Rispens) strains of Marek's disease virus. *J. Gen. Virol* 88:1080–1096.

Suresh, P., Johnson Rajeswar, J., Sukumar, K., Harikrishnan, T. & Srinivasan, P. 2013. Incidence of Marek's disease in vaccinated flocks. *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences*, 3: 200–202.

Suresh, P., Johnson Rajeswar, J., Sukumar, K., Harikrishnan, T. & Srinivasan, P.. 2015. Pathotyping of recent Indian field isolates of Marek's disease virus serotype 1. *Acta Virologica*, 59: 156–165.

- Suresh, P., Johnson Rajeswar, J., Sukumar, K., Harikrishnan, T. & Srinivasan, P.. 2017. Complete nucleotide sequence analysis of the oncogene “Meq” from serotype 1 Marek’s disease virus isolates from India, *British Poultry Science*, 58: 111-115.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipinski, A.; Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Teng, L. Q.; Wei, P.; Song, Z. B.; He, J. J.; Cui, Z. Z. 2011. Molecular epidemiological investigation of Marek’s disease virus from Guangxi, China. *Arch. Virol*; 156: 203-206.
- Tian, M., Zhao, Y., Lin, Y., Zou, N., Liu, C., Liu, P. & Huang, Y. 2011. Comparative analysis of oncogenic genes revealed unique evolutionary features of field Marek’s disease virus prevalent in recent years in China. *Virology Journal*, 8: 1–11.
- Torres, A. C. D.; Marin, S.Y; Costa, C. S.; Martins, N.R.S. 2019. An overview on Marek's disease virus evolution and evidence for increased virulence in Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 21, p. 001-008.
- Tulman, E. R.; Afonso, C. L.; Lu, Z.; Zsak, L.; Rock, D. L.; Kutish, G. F. 2000. The genome of a very virulent Marek’s disease virus. *J. Virol.* 74:7980–7988.
- Wajid, S.J., Katz, M.E., Renz, K.G. and Walkden-Brown, S.W. 2013. 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 Dis.*, 57: 562-568.
- Willner, D.; Thurber, R. V.; Rohwer, F. 2009. Metagenomic signatures of 86 microbial and viral metagenomes. *Environmental microbiology*. 11. 1752-66.
- Witter, R. L.; Moulthrop, J. I.; Burgoyne, R. G. H.; Connell, H. C. 1970. Studies on the epidemiology of Marek’s disease herpesvirus in broiler flocks. *Avian Dis.*, 14:255-267.
- Witter, R. L.; Lee, L. F.; Bacon, L. D.; Smith, E. J. 1979. Depression of vaccinal immunity to Marek’s disease by infection with reticuloendotheliosis virus. *Infect. Immun.* 26:90–98.
- Witter, R.L. 1997. Increased virulence of Marek’s disease virus field isolates. *Avian Dis.* 41, 149–163.
- Witter, R. L.; Schat, K. A. 2003. Neoplastic diseases: Marek’s disease. In: SAIF, Y. M., BARNES, H. J., FADLY, A. M., GLISSON, J. R., MCDUGALD, L. R.; SWAYNE, D.E. (Eds). *Diseases of poultry*. 11th ed. Ames: Iowa State University. p. 407-465.
- Witter, R.L.; Calnek, B.W.; Buscaglia, C.; Gimeno, I.M.; Schat, K.A. 2005. Classification of Marek’s disease viruses according to pathotype: philosophy and methodology. *Avian Pathol.* 34, 75–90.

Witter, R., I. Gimeno, A. Pandiri, and A. Fadly. Tumor diagnosis manual: the differential diagnosis of lymphoid and myeloid tumors in the chicken, 1st ed. AAAP, Inc. Omnipress, Jacksonville, FL. 2010.

Wooley, J. C., Godzik, A.; Friedberg, I. 2010. A primer on metagenomics. *PLoS Comput. Biol.* 6:e1000667. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000667

Wózniaowski, G., E. Samorek-Salamonowicz, and W. Kozdrun'. Sequence analysis of meq oncogene among Polish strains of Marek's disease. *Pol. J. Vet. Sci.* 13:263–267. 2010.

Wózniaowski, G., E. Samorek-Salamonowicz, and W. Kozdrun'. 2011. Molecular characteristics of Polish field strains of Marek's disease herpesvirus isolated from vaccinated chickens. *Acta Vet. Scand.* 53:10..

Yu, Z. H., M. Teng, J. Luo, X. W. Wang, K. Ding, L. L. Yu, J. W. Su, J. Q. Chi, P. Zhao, B. Hu, G. P. Zhang, and J. X. Liu. 2013. Molecular characteristics and evolutionary analysis of field Marek's disease virus prevalent in vaccinated chicken flocks in recent years in China. *Virus Genes* 47:282–291.

Zhang, Z.; Cui, Z. 2005. Isolation of recombinant field strains of Marek's disease virus integrated with reticuloendotheliosis virus genome fragments. *Sci China C Life Sci.*; 48(1):81–8.

Zhang, Y. P.; Liu; C. J.; Zhang, F.; Shi, W.; Li, J. 2011. Sequence analysis of the Meq gene in the predominant Marek's disease virus strains isolated in China during 2006–2008. *Virus Genes* 43:353–357.

Zhang, F., C. J. Liu, Y. P. Zhang, Z. J. Li, A. L. Liu, F. H. Yan, F. Cong, and Y. Cheng. Comparative full-length sequence analysis of Marek's disease virus vaccine strain 814. *Arch. Virol.* 157:177–183. 2012.

Zhuang. X.; Zou, H.; Shi, H.; Shao, H.; Ye J.; Miao, J.; Wu G.; Qin, A.. 2015. Outbreak of Marek's disease in a vaccinated broiler breeding flock during its peak egg-laying period in China. *BMC Veterinary Research.* 11, 157.