

DOENÇA DE MAREK



Paulo Lourenço Silva

Professor Titular Universidade
Federal de Uberlândia

NEOPLASIA E IMUNOSSUPRESSÃO

Novos e antigos desafios de
uma das principais doenças da
avicultura industrial

Passadas quatro décadas de extraordinário progresso de pesquisas sobre o vírus da doença de Marek (VDM) ou herpesvírus Gallid 2 (GaHV-2), agente etiológico responsável pela doença de Marek (DM) nas aves, uma doença amplamente reconhecida pela indução de linfoma maligno de células T, grandes avanços foram obtidos na compreensão do vírus, os mecanismos de patogênese da doença, os métodos de diagnóstico e no controle por meio de diferentes gerações de vacinas. No entanto, a DM continua apresentando grandes desafios na maioria dos países com avicultura industrial, especialmente quanto ao aumento da virulência e emergência de novos patótipos. Promover mais pesquisas sobre os mecanismos moleculares da doença, resistência genética, proteção induzida pelas vacinas e evolução de virulência serão necessários para desenvolver estratégias de controle mais sustentáveis nos próximos anos.

INTRODUÇÃO

As doenças neoplásicas em aves domésticas são de importância econômica na avicultura industrial devido às perdas resultantes da alta mortalidade, baixo desempenho e imunossupressão. A doença de Marek (DM) e a leucose aviária (LA) são as duas doenças neoplásicas mais conhecidas e de maior importância econômica na maioria dos países com avicultura industrial. A reticuloendoteliose é outra doença neoplásica que pode infectar várias espécies de aves. No entanto, devido à sua natureza esporádica e subclínica de infecção, atualmente nenhuma medida de controle específica tem sido praticada rotineiramente pela indústria avícola.

Apesar do extraordinário progresso nas últimas quatro décadas de pesquisa sobre a doença de Marek (DM), proporcionando grandes avanços na compreensão do vírus, mecanismos patogênicos da doença, métodos de diagnóstico e no controle por meio de diferentes gerações de vacinas, a DM continua sendo um tema de preocupação, embora a situação atual indique a ausência de problemas de DM na maioria dos países com avicultura industrial, especialmente quanto ao aumento da virulência e emergência de novos patótipos. Se os surtos ocorrem é importante que o diagnóstico correto seja feito.

Promover mais pesquisas sobre os mecanismos moleculares da doença, resistência genética, proteção induzida pelas vacinas e evolução de virulência serão necessários para desenvolver estratégias de controle mais sustentáveis nos próximos anos.

O propósito deste artigo é fornecer uma atualização geral sobre a doença de Marek, portanto não se trata de uma revisão formal.

A DOENÇA

Doença de Marek é uma enfermidade linfoproliferativa das galinhas, altamente contagiosa, causada por um herpesvírus oncogênico associado à célula, que se caracteriza por infiltração mononuclear em uma ou mais das seguintes estruturas: nervos periféricos, gônadas, íris, órgãos viscerais, músculo e pele. A lesão mais característica é o aumento dos nervos periféricos, especialmente o ciático, vago e plexo braquial, que se apresentam edematosos e destituídos das estruturas transversais.

A HISTÓRIA

József Marek, patologista médico veterinário húngaro descreveu a forma neural da doença em 1907 pela observação de paralisia das pernas e asas de galos, e considerou ser um processo inflamatório de nervos periféricos, denominando de polineurite. Duas décadas mais tarde reconheceu-se que os tumores linfóides seriam uma parte da doença e que ela se comportava como uma doença infecciosa. Houve pouco progresso no conhecimento da DM até a década de 1960, apesar da doença ter se tornado muito mais grave do que descrita anteriormente, com perdas econômicas significativas para a indústria avícola. Geralmente as taxas de mortalidade alcançavam 10% a 30%, e em alguns casos, chegavam a 60% - 80%. DM estava disseminada com grande impacto econômico para a indústria avícola em todos os países desenvolvidos ou em desenvolvimento.



József Marek

Patologista médico veterinário

A década de 1960 foi um período de notável progresso no conhecimento da doença, que foi reproduzida utilizando sangue e células tumorais de aves doentes, demonstrando ser uma doença infecciosa e contagiosa. Devido à gravidade da doença, a indústria avícola estava "ansiosa" para obter meios de preveni-la ou controlá-la. Publicações nas décadas de 1940 e de 1950 mostraram que havia um grau de controle na resistência genética e susceptibilidade à DM. No entanto, o principal impulso das pesquisas foi para a compreensão da doença e determinação da sua causa.

Durante a década de 1960 foi demonstrado que o agente causador era um herpesvírus e que, isolado, poderia variar em patogenicidade - de apatogênicos para altamente oncogênicos. O vírus era associado à célula em todas as células infectadas de uma galinha infectada, exceto nos folículos das penas, onde vírus livres de células podiam ser isolados. Isso fundamentou uma explicação para sua natureza contagiosa e a infectividade da poeira do ambiente de criação das aves, que em parte é composta da descamação do epitélio do folículo das penas.

No final desta década, desenvolveu-se uma vacina atenuada e também uma vacina antigenicamente relacionada ao herpesvírus de perus (HVT), e ambas foram eficazes contra o desafio com amostra patogênica no campo. As vacinas tornaram-se amplamente disponíveis em todo o mundo e a DM começou a ficar sob controle.

No início da década de 1970, descreveu-se o uso de vírus atenuado da DM, amostra CVI 988 como uma vacina (Rispens). A vacina HVT tornou-se de uso disseminado em todo o mundo e eficaz no controle da DM. No entanto, no final da década de 70, com o aparecimento de isolados de VDM mais virulentos comparados aos isolados anteriores, a vacina HVT, que até então era amplamente utilizada, não fornecia boa proteção contra essas amostras variantes “muito virulentas” do VDM. No início desta década foi publicado um relatório sobre a vacina CVI988 (Rispens), mas infelizmente o dr. Bart Rispens morreu antes da vacina torna-se rotineiramente utilizada.

Na década de 1980 foi desenvolvida uma vacina bivalente como exemplo, o herpesvírus de perus sorotipo 3 - combinado com o sorotipo 2 - SB-1 (vírus não patogênico isolado de galinhas). Os estudos demonstraram que a combinação do sorotipo 3 (HVT) com o sorotipo 2 (SB1) foi melhor do que seu uso isoladamente no controle dos vírus muito virulentos da DM. Essas vacinas bivalentes foram eficazes até o início da década de 90, quando outra vez surgiu uma nova amostra de vírus “muito muito virulento” (vv MDV) do VDM, a qual foi capaz de romper a imunidade vacinal.

A década de 2000 foi marcada por avanços tecnológicos significativos na manipulação genética de genomas virais, incluindo a patogênese, vacinas e estudos biológicos moleculares.

Na década atual, a DM continua a ser um dos temas mais importantes de interesse científico, tanto por sua importância como uma das principais doenças que afetam a saúde das aves, como um excelente modelo de estudo de linfomas induzidos por herpesvírus em seus hospedeiros naturais. Como ameaça de doença, a maior preocupação da indústria avícola é a contínua evolução de virulência e o surgimento de cepas mais virulentas de VDM, apesar da vacinação difundida. Ao mesmo tempo, o melhor entendimento dos mecanismos de proteção induzida por vacinas DM também é importante. Algumas das novas gerações de vacinas “molecularmente definidas” demonstraram uma proteção melhor do que a maioria das vacinas atualmente utilizadas.

O histórico da ocorrência ou aumento de casos da DM no Brasil, na sua forma neoplásica, é semelhante àquela descrita no mundo. Como se sabe, o aumento de casos da neurolinfomatose causada pelo VDM está relacionado com aumento da disseminação, contaminação ou contágio com vírus do tipo muito virulento (vv MDV), que superam a imunidade induzida pelas cepas HVT e SB1. Este fenômeno, denominado de “quebra da vacinação”, ocorreu no início da década de 1990 no Brasil. Em 1992/1993 foi introduzida no Brasil a vacina do sorotipo 1 (GaHV-2), amostra CVI 988 (Rispens) e observada uma redução dos casos de DM.

Histórico da evolução da doença de Marek

<p>1907-1950 Marek Clássica (mMDV)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Primeira descrição • Polineurite - paralisia de pernas e asas
<p>1950-1960 Marek Virulenta (vMDV)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tumores linfóides em vísceras • Mortalidade 10% até 70% • Vacina Herpesvírus de Perus (HVT) - Sorotipo 3
<p>1970-1980 Marek Muito Virulenta (vvMDV)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Rompe a proteção conferida pela HVT • Vacina CVI 988 (Rispens) - Sorotipo 1 • Vacina SB1 - Sorotipo 2 • Combinação de HVT com SB1
<p>1990 - Hoje Marek Muito Virulenta Plus (vv+MDV)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Rompe a imunidade por Rispens ou bivalentes • Doença aguda • Arteriosclerose • Mortalidade em aves jovens



IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

O VDM é ubíquo; ocorre em praticamente todos os países de produção avícola industrial e muitas aves em um lote podem estar infectadas com o VDM. A doença pode estar ocorrendo sem ser reconhecida, em decorrência da falta de diagnóstico, ou onde outras doenças de caráter agudo estiverem mascarando o problema. Antes da introdução da vacina em 1970, morbidade e mortalidade ultrapassavam 60% em lotes de postura comercial, e perdas de 30% em lotes de reprodutoras e frangos de corte eram comuns. Condenações de carcaças de frangos no abatedouro eram extremamente elevadas.

Com a adoção da vacinação contra a DM, a incidência da doença reduziu significativamente e a mortalidade em reprodutoras e poedeiras caiu para 3% a 5%. Em alguns países os índices eram ainda menores (em torno de 0,5%). Atualmente, os problemas de DM são mais graves onde há grande concentração de aves e amostras mais virulentas do vírus. Aves acometidas pela DM apresentam baixos índices de produção – pico de produção de ovos, conversão alimentar e outros – além de uma taxa de mortalidade mais elevada.

ETIOLOGIA

O VDM pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, e ao gênero *Mardivirus* (*Marek's*

disease-like viruses). VDM foi inicialmente classificado dentro de *Gammaherpesvirinae* devido a suas propriedades biológicas, mas após o sequenciamento completo do seu genoma em 2002, foi reclassificado no novo gênero de *Mardivirus*. O genoma do VDM está constituído de DNA. Atualmente, este gênero é composto por quatro outras espécies: *Gallid herpesvirus 3* (GaHV-3), *Meleagrid herpesvirus 1* (MeHV-1) - conhecido como herpesvírus de perus (HVT), *Anatid herpesvirus 1* e *Columbid herpesvirus 1*.

GaHV-3 (anteriormente denominado VDM sorotipo 2 - VDM 2) e HVT (anteriormente denominado VDM sorotipo 3 - VDM 3), infectam aves domésticas com o VDM, mas não são oncogênicos. Todos os vírus oncogênicos da DM são classificados como *Gallid herpesvirus 2* (GaHV-2, anteriormente denominado VDM sorotipo 1 - VDM 1).

Com base em sua capacidade de induzir lesões de DM em aves vacinadas com HVT ou vacinas bivalentes contendo HVT e sorotipo 2 (GaHV-3) do VDM, isolados patogênicos de campo do sorotipo 1 do VDM (GaHV-2) têm sido classificados dentro de três patotipos: a) virulento; b) muito virulento; e c) muito muito virulento. O isolamento destes vírus *muito muito virulentos* de lotes vacinados com aumento de perdas de DM fornecem evidências para o VDM prosseguir evoluindo em direção à maior virulência.

Três formas de infecção pelo VDM são reconhecidas:

1. Infecção completamente produtiva ocorre no epitélio do foliculo da pena das galinhas e resulta no desenvolvimento de envelope, virions infecciosos completos.

2. Infecção produtiva-restritiva ocorre em algumas células linfóides e epiteliais em galinhas e na maioria das células cultivadas onde antígenos são produzidos, mas os virions não estão envelopados e, portanto, não infecciosos. O segundo tipo de infecção é infecção latente não produtiva, que ocorre predominantemente em células T.

3. Infecção de transformação, que ocorre somente em linfócitos T de galinhas e somente com o VDM virulento. Provavelmente, infecção latente é requerida para formação tumoral pelo VDM. Ao contrário da infecção latente, na qual o genoma viral está presente, mas não se expressa, infecção de transformação é caracterizada por expressão limitada do genoma do VDM. Seguindo a infecção com VDM, galinhas tornam-se portadoras e disseminam constantemente o VDM no meio ambiente.

Apesar do VDM ser sensível à maioria dos desinfetantes e detergentes devido ao seu envelope lipídico, ele apresenta alta resistência e longevidade no meio ambiente. Na cama do galpão o VDM pode sobreviver à temperatura ambiente por 16 semanas. Penas ressecadas de aves infectadas podem manter a infectividade por oito meses à temperatura ambiente e à poeira dos galpões por, no mínimo, 4 a 6 meses. A DM apresenta uma maior resistência em temperaturas mais baixas e pode se agravar durante o inverno principalmente em sistemas de criação com ambientes fechados.

Entre todos os herpesvírus, o VDM apresenta o maior grau de afinidade com a célula a qual está associado e, portanto, é o vírus menos citolítico da família. Assim, ao invés de causar destruição celular, o VDM induz a formação de tumores (vírus oncogênico). Quando o vírus não se encontra associado à célula, torna-se muito frágil e pode ser facilmente destruído por desinfetantes comuns. Pode ocorrer replicação viral no organismo das aves durante toda a vida, com eliminação de partículas virais no ambiente, sem manifestação de sintomas nas aves, inclusive em aves vacinadas (portadores são).

A EVOLUÇÃO DO VÍRUS

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

ram imensamente o ambiente de criação das aves. Até meados da década de 60, quando a produção avícola ainda era em escala intensiva, tanto o vírus como os hospedeiros eram capazes de alcançar um estado de coexistência equilibrada. No entanto, a transformação da indústria avícola nas práticas intensivas de produção no início dos anos 60 apontava uma grande mudança neste equilíbrio, em favor do vírus. A disponibilidade contínua de grandes populações geneticamente suscetíveis capacitou o vírus para a rápida disseminação, promovendo sua evolução rápida para uma maior virulência. Isso foi evidente quando surtos de DM “varreram” plantéis de aves nos anos 60, eliminando grandes populações de aves ao redor o mundo.

Essa mudança no equilíbrio em favor do vírus logo foi corrigida com o desenvolvimento de vacinas contra VDM. A primeira vacina era uma amostra atenuada (HPRS-16) do sorotipo 1 do VDM (GaHV-2), seguida pelo desenvolvimento de uma vacina com amostra de herpesvírus de peru (HVT), antigenicamente relacionada. A vacinação sistemática das aves forneceu uma arma importante contra o vírus e reduziu significativamente as perdas.

O uso das vacinas de HVT no início da década de 70 mostrou uma redução imediata nas perdas pela DM. No entanto, o êxito com a vacinação de HVT não pôde ser sustentado uma vez que relatos de perdas por DM em plantéis vacinados com HVT começaram a ocorrer novamente no final da década de 70 devido a infecções com amostras mais virulentas do VDM (designados *patotipos muito virulentos* - vvMDV). A resposta da indústria a tais surtos foi a introdução de uma vacina bivalente mais eficiente que consistia na aplicação de vacinas HVT e vacina com o sorotipo 2 (GaHV-3).

Essa nova estratégia introduzida nos anos 80 foi capaz de conter perdas de DM até o início e meados da década de 1990, quando as perdas pela DM aumentaram outra vez com novos surtos da doença por causa do surgimento de amostras ainda mais virulentas (*patotipos muito muito virulentos* - vv+MDV). Outra vez a indústria foi forçada a adotar nova estratégia com a introdução de uma vacina mais eficiente CVI988, desenvolvida a partir de um isolado natural do sorotipo 1 do VDM (GaHV-2). Mais uma vez, essa estratégia tem se mostrado eficiente para o controle de perdas. No entanto, a experiência passada nos mostra que é possível que mais mudanças em virulência e surgimento de amostras mais virulentas ocorram no futuro, já que existem evidências de alguns isolados recentes do

VDM com patogenicidade mais elevada para frangos vacinados com CVI988. Barrar os processos evolutivos do VDM será um desafio importante para o controle da DM no futuro. A amostra CVI988 é uma das últimas vacinas eficientes contra VDM atualmente disponíveis e aumento de mais virulência pode ter efeitos catastróficos na indústria avícola.

O surgimento dos patótipos mMDV, vMDV, vvMDV e vv + de MDV retrata um quadro de evolução passo a passo e periódica do VDM em resposta à introdução de gerações diferentes de vacinas. Análise sistemática das características patotípicas e grau de virulência das amostras de VDM isolados de vários surtos durante o período 1987-1995 demonstram que a evolução do VDM para aumento de virulência ocorre como uma série, com os isolados mais recentes mostrando os fenótipos bem virulentos.

EPIDEMIOLOGIA

A situação global atual

O VDM existe virtualmente em todas as áreas de produção avícola industrial no mundo. Embora já tenham se passado mais de 40 anos desde que a primeira vacina contra DM tornou-se disponível, a doença continua causando problemas em muitos países - numa escala muito menor do que antes do advento da vacinação.

Mais recentemente, apesar do uso permanente de vacinas comerciais, novos patótipos e amostras patogênicas de campo continuam a aparecer periodicamente, aumentando as dificuldades no controle da DM. É muito difícil generalizar os problemas de DM devido às diferentes experiências de país para país. Alguns países relatam um bom controle da doença, utilizando apenas vacina liofilizada HVT livre de células; outros têm sérios problemas de perdas apesar do uso de vacinas congeladas associadas às células, combinadas. Existem outros fatores de manejo envolvidos além da vacinação, mas parece que a virulência básica do vírus de campo e a prevalência da DM são bastante variáveis entre países e entre regiões de um mesmo país, em diferentes estações do ano e localizações.

Regra geral, a maioria dos surtos atuais de DM são atribuídos a problemas de manejo e falhas de vacinação. Falhas de vacinação da DM podem ter muitas causas, incluindo administração incorreta da vacina, o uso de subdoses de vacina (diluição excessiva da vacina), co-infecção com agentes imunossupressores como o



vírus de anemia infecciosa das galinhas, possível surgimento de patótipo muito virulento do VDM - patótipos do VDM tornaram-se cada vez mais virulentos desde a década de 1960; as causas desta evolução viral não estão bem esclarecidas -, exposição precoce aos vírus patogênicos ou falhas nos programas de biossegurança. Nos países onde são adotados bons programas de limpeza e desinfecção dos galpões após a retirada de cada lote, e um intervalo adequado de "descanso" das instalações, as probabilidades de êxito das vacinas contra a DM são muito maiores. A eficácia da vacinação pode ser monitorada usando ensaios quantitativos de PCR e DNA obtido a partir de penas.

Revacinação está aumentando cada vez mais, tornando-se uma abordagem comum especialmente em reprodutoras, mas essa prática permanece controversa por falta de base científica.

No presente, CVI988 continua a ser uma vacina de padrão-ouro e não está bem claro se vacinas melhores estarão



O vírus de Marek é eliminado pelos folículos da pena e pode estar localizado no poeira das instalações

disponíveis para licenciamento em um futuro próximo.

Espécies suscetíveis

Galinhas são os hospedeiros naturais mais importantes. Tem sido sugerido que a DM pode ser observada em várias espécies aviárias, tais como peru, faisão, pombo, pato, ganso, canário, codorna e outras.

Transmissão

O VDM se dissemina por transmissão horizontal através do contato direto e indireto entre aves, por via aerógena. Não existem evidências de transmissão vertical do VDM. Porém, vírus podem ser encontrados aderidos à casca dos ovos, possibilitando a exposição do pinto de um dia ao VDM, no momento da eclosão.

O folículo da pena é o sítio primário de replicação viral, e a descamação de células epiteliais infectadas dos folículos durante a nova formação do empenamento é

a principal fonte de contaminação do meio ambiente. As células descamadas constituem parte da poeira do galpão e penetram no trato respiratório das aves. A excreção do VDM através das células epiteliais dos folículos das penas pode iniciar-se desde a segunda semana de idade. Uma vez que o vírus está protegido dentro das células descamadas, tende a permanecer viável por longos períodos fora do hospedeiro natural, e associado ao fato de que as aves podem ser portadoras de VDM, disseminando-o permanentemente nas instalações, a excreção contínua do vírus leva à contaminação contínua do meio ambiente e, conseqüentemente, à difusão eficiente da doença.

Fatores predisponentes

- a) Biossegurança precária
- b) Interação entre falhas de manejo e ambiência
- c) Lavagem e desinfecção inadequadas
- d) Curto intervalo de descanso das instalações
- e) Falha na queima de penas / penugens entre lotes
- f) Elevada densidade de aves por m²
- g) Sistema de ventilação ineficiente
- h) Doenças concomitantes
- i) Manejo precário da alimentação e presença de micotoxicoses
- j) Complexos de produção de idades múltiplas

SINAIS CLÍNICOS

A expressão dos sinais clínicos e as lesões da DM podem ser influenciadas pela idade, imunocompetência e resistência genética. A DM afeta aves a partir da sexta semana de idade, sendo mais comum entre a 12^a e 24^a semana. O período de incubação é variável, podendo ser de três a quatro semanas, ou até vários meses. Do ponto de vista clínico, são conhecidas três formas da DM: forma clássica, forma aguda e paralisia temporária.

a) Forma clássica. Refere-se à forma neurológica da doença. Geralmente ocorre em aves ao redor de 18 semanas de idade e mortalidade variável entre 3% e 10%. Caracterizada por paresia assimétrica progressiva das patas ou asas, e a seguir paralisia completa de uma ou mais extremidades. Os principais sinais clínicos



Galinhas com Marek: prostração e caquexia

incluem asas caídas e incoordenação ou dificuldade locomotora, que podem ser o primeiro sintoma observado. Uma atitude característica consiste na abertura das pernas - uma para frente e outra para trás - como resultado de paresia unilateral ou paralisia da perna. Pode ocorrer ainda envolvimento do nervo vago, resultando em paralisia e dilatação do papo.

b) Forma aguda. Pode surgir precocemente, desde 7-8 semanas de idade. Surto estão mais frequentemente relacionados com a formação de tumores múltiplos e difusos nos órgãos viscerais, possivelmente relacionados com o surgimento de amostras mais virulentas do vírus, causando maior incidência da doença. A forma aguda é caracterizada por alta mortalidade, palidez da crista e patas, letargia, perda de peso e queda de postura. Pode ocorrer cegueira por lesões envolvendo a íris.

c) Paralisia temporária. Encefalite que acomete aves jovens e de observação relativamente rara. Caracteriza-se por paralisia súbita das pernas e pescoço, duração de aproximadamente três dias, seguida de recuperação, e morte das aves algumas semanas mais tarde, devido à DM.

ALTERAÇÕES PATOLÓGICAS

Patogenia

O vírus penetra no sistema respiratório das aves através da inalação de partículas infectantes que invadem diretamente o pulmão. O vírus é capturado por células

fagocitárias do pulmão (macrófagos) e transportado para os órgãos linfóides - linfócitos B do baço, timo, bolsa cloacal e provavelmente tecidos linfóides de órgãos epiteliais. Apesar do timo conter somente 10% de linfócitos B, é possível localizar o vírus neste órgão desde as etapas iniciais da infecção.

Nos órgãos linfóides, onde ocorre a **primeira fase de replicação ativa de vírus**, podem-se detectar antígenos virais internos conhecidos como VIA. Infecção também pode ser produzida sem gerar novas partículas virais - conhecidas como infecção não produtiva - e tem menor importância. Esta primeira etapa ou fase de infecção denomina-se primeira fase citolítica. Na primeira replicação formam-se múltiplos focos de necroses causados pela infecção nos órgãos linfóides. O resultado é um estado de imunossupressão permanente, detectável duas ou três semanas após a infecção, e que envolve tanto a imunidade humoral como a resposta imunológica mediada por células; o baço aumenta de tamanho, a bolsa cloacal atrofia-se e o timo sofre necrose. Todos esses eventos ocorrem durante os primeiros quatro a sete dias após a infecção.

A segunda fase da infecção é conhecida como fase de infecção latente e inicia-se ao final da fase citolítica, ou seja, cinco a sete dias pós-infecção. Nessa fase o objetivo do vírus são os linfócitos T ativados. Tem sido identificado pelo menos sete subpopulações de linfócitos T distintos, que pode ser o alvo na etapa de infecção latente. Mas o principal tipo de linfócito T afetado é o linfócito T helper (CD4), o que tem grande importância sob o ponto de vista imunológico, pois sem a completa funcionalidade desta subpopulação de células não é possível uma resposta humoral adequada. O segundo objetivo na fase de latência são os linfócitos T citotóxicos (CD8). Os linfócitos T infectados na forma latente passam à circulação, produzindo-se os primeiros estágios de viremia e redistribuição do vírus a distintos tecidos epiteliais. Nestes tecidos pode-se identificar um novo antígeno, conhecido como MATSA, o qual está presente somente em células infectadas. Uma vez infectados os órgãos epiteliais - fígado, rins, pâncreas, proventrículo etc. -, o vírus não requer imediatamente linfócitos ou células fagocíticas para sua propagação dentro dos órgãos, pois a infecção pode ser facilmente conduzida de uma célula a outra sem requerer necessariamente uma fase de viremia.

Um dos tecidos epiteliais infectados de maior importância é o folículo da pena, que é praticamente o único sítio onde se produz infecção produtiva abundante. Nesse sí-

tio são produzidas partículas virais completas e infectantes que são liberadas no meio ambiente e infectam aves suscetíveis. A reação inflamatória no epitélio do foliculo da pena é intensa e visível macroscopicamente em alguns casos, sendo causa de condenação no abatedouro.

Ao final da fase de infecção latente é produzida uma **nova fase de infecção citolítica nos órgãos linfóides**, aumentando assim o dano à capacidade de resposta imunológica. Nessa fase também se inicia a infiltração de células T infectadas em múltiplos órgãos, como o tecido muscular, pulmão, tecidos epiteliais, e sistema nervoso central e periférico. A infiltração linfocitária nos nervos periféricos induz neuropatias facilmente reconhecíveis clinicamente ou mediante inspeção macro e microscópica. Quando as lesões induzem uma infiltração maciça dos nervos com linfócitos denomina-se neuropatia tipo A. Se as lesões apresentam desmielinização - uma resposta inflamatória leve e uma infiltração ligeira de linfócitos com presença de edema - são chamadas do tipo B. Outros vírus são capazes de induzir lesões muito similares, como é o caso do retrovírus que causa a reticuloendoteliose.

NEOPLASIA E IMUNOSSUPRESSÃO

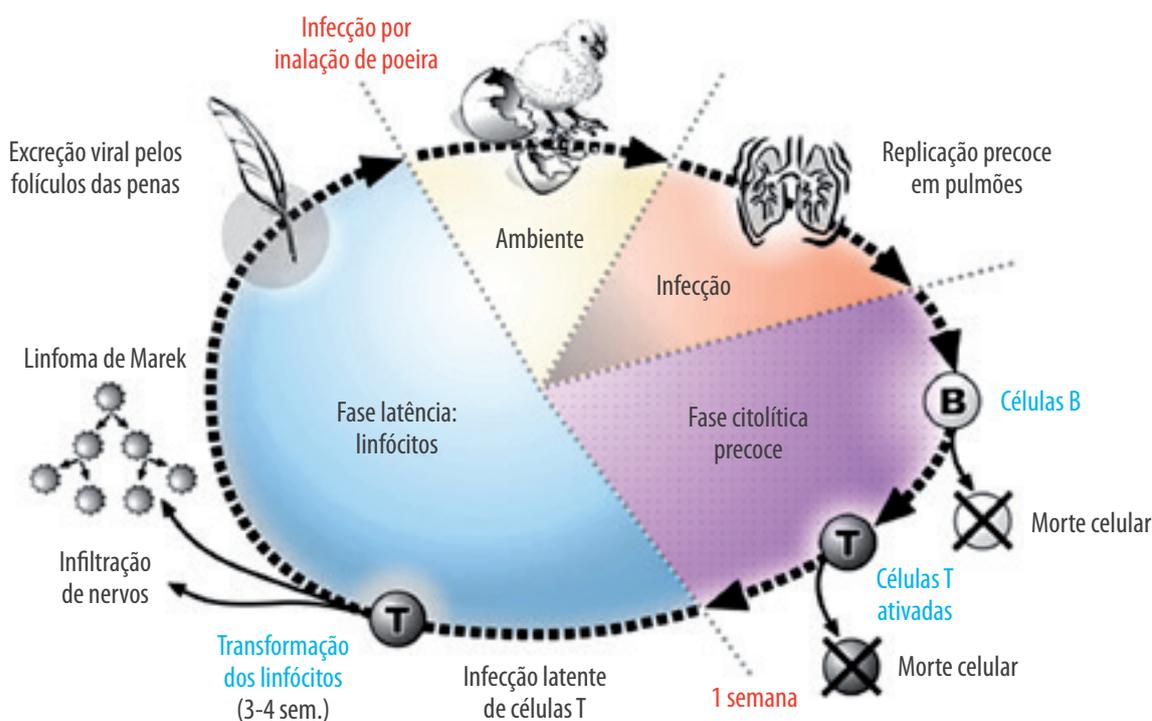
A doença de Marek é uma enfermidade viral contagiosa das aves. O vírus da DM tem dupla ação patogênica, porque tardiamente produz tumores e prematuramente produz imunossupressão.

A DM tem quatro fases de infecção:

- Produtiva restritiva: alterações degenerativas primárias;
- Latente;
- Citolítica com imunossupressão permanente;
- Proliferativa: tumoração.

O vírus ingressa via respiratória e é transferido a órgãos linfóides por células fagocíticas. A infecção citolítica é detectada rapidamente no baço, bolsa cloacal e timo durante a primeira semana de vida. A principal célula afetada é o linfócito B, mas também alguns LT CD4 + CD8 + ativados podem ser alvo do vírus, esta é a razão da imunossupressão prematura.

Figura esquemática mostrando as diferentes fases de patogênese da DM



(Adaptado: Schat & Nair, 2008)



Tumor em baço



Tumor difuso em fígado

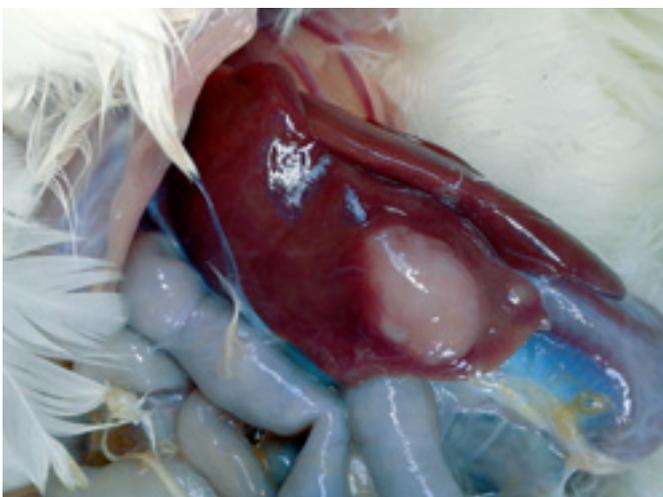
Além de linfócitos as células do epitélio do folículo das penas também são alvos do vírus, sendo este o único local onde são produzidas partículas virais infecciosas (com envoltório), para que as penas sejam a principal fonte de contaminação viral.

Lesões macroscópicas

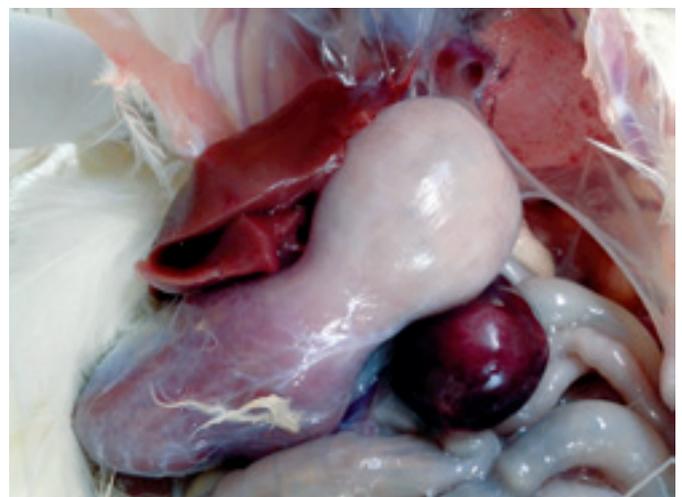
As lesões nervosas são as mais constantes em aves infectadas, com envolvimento de um ou mais nervos periféricos. Os plexos nervosos celíaco, ciático e braquial encontram-se aumentados de volume. Os nervos periféricos afetados são caracterizados pela perda das estrias transversais, coloração cinza ou amarelada e, algumas vezes, aspecto edematoso.

Frequentemente, as lesões são unilaterais, sendo importante a comparação de nervos opostos em casos onde existem poucas alterações patológicas. Tumores viscerais são especialmente comuns nas formas agudas da doença, podendo ser encontrados mesmo na ausência de lesões nervosas macroscópicas. Gônadas, fígado, baço, pulmão, rim e proventrículo são mais afetados. É evidente que o aumento de volume dos órgãos algumas vezes atinge dimensões muito maiores do que seu tamanho normal.

Músculos esqueléticos (peitorais e músculos das asas) podem apresentar pequenos tumores nodulares superficiais ou profundos de coloração branco-amarelada. Na pele se observam nódulos esbranquiçados associados aos folículos das penas.



Tumor nodular em fígado



Tumor em proventrículo

Lesões microscópicas

A população celular na DM é pleomórfica, com células maduras e imaturas, assim como células blásticas degeneradas, denominadas “células da doença de Marek”.

Dois tipos diferentes de lesão podem ser evidenciados na DM: a lesão do tipo A - de característica neoplásica, encontrada em linfomas, com células linfoblásticas em proliferação e em nervos, com desmielinização e proliferação de células de Schwann e degeneração -; e a lesão do tipo B - de característica inflamatória, observada em nervos. Podem ser observadas infiltrações de pequenos linfócitos e células plasmáticas, usualmente com edema e, algumas vezes, com desmielinização e proliferação de células de Schwann.

DIAGNÓSTICO

Os dados clínico-patológicos e epidemiológicos podem ser bastante sugestivos de um problema de DM. Regra geral, a presença de tumores em aves jovens, a sintomatologia nervosa e as alterações de nervos periféricos ou do globo ocular são critérios suficientes para considerar que o VDM poderia ser a causa do problema.

Na apresentação clássica da DM se observa uma alta frequência de aves com neuropatias, incluindo infiltrações linfocitárias não supurativas no encéfalo e lesões tumorais em aves de 8 a 20 semanas de idade, apesar de terem sido detectados casos a partir de quatro semanas de vida. Atualmente são frequentes casos atípicos, difíceis de serem encontradas em aves com lesões do sistema nervoso periférico causando paralisias. Em muitos destes casos somente se detectam aves com infiltrações na retina, íris, encéfalo e órgãos internos, sem lesões nos nervos periféricos. O diagnóstico é ainda mais difícil em lotes com mais de 20 semanas de idade.

A histopatologia é uma das ferramentas mais importantes para diagnosticar DM. O diagnóstico histopatológico deve ser realizado nas amostras de tumores e de nervos periféricos (plexos dos nervos: vago, braquial e ciático) e sistema nervoso central, fixados em formol a 10%. Histologicamente, os tumores apresentam um aspecto pleomórfico e se caracterizam por infiltrados de células mononucleares muito heterogêneos (em tamanho e morfologia), fundamentalmente por linfócitos e macrófagos. É frequente observar mitoses múltiplas, e em muitos casos, mitoses atípicas características de tumores malignos. Pode-se observar a presença das chamadas “células de Marek” que são

linfoblastos em degeneração, mas nem sempre estão presentes nos tumores.

As amostras de baço, bolsa cloacal, timo, sangue periférico e polpa das penas, podem ser utilizados para o isolamento do vírus e para métodos de detecção de DNA viral pela PCR convencional e PCR em tempo real - técnica esta de eleição para quantificação do genoma do VDM oncogênico em tumores, sangue e polpa de penas.

Diagnóstico diferencial

DM é caracterizada por infiltração linfocítica de vários nervos periféricos e órgãos viscerais particularmente, o baço e as gônadas. A natureza linfoproliferativa das lesões DM pode ser confundida com linfomas induzidos por vírus da leucose aviária (VLA) e reticuloendoteliose (VRE). Abaixo uma tabela com as principais diferenças entre os agentes tumorais em aves.

	Marek	Leucose	RE
Paralisia	Comum	Ausente	Rara
Lesão em nervos	Comum	Ausente	Comum
Tumor em bolsa	Raro	Comum	Raro
Atrofia em bolsa	Comum	Raro	Comum
Lesão na pele	Comum	Raro	Raro
Lesão no coração	Comum	Raro	Comum

CONTROLE

A primeira intervenção na prevenção da DM é a limpeza e desinfecção dos galpões e equipamentos antes do alojamento do novo lote. Intervalos entre lotes sucessivos, remoção da cama, poeira e matéria orgânica, limitarão a contaminação do novo lote. Quanto mais cedo o VDM infectar os pintinhos, maior será a incidência da doença. Portanto, as primeiras duas a três semanas de vida são as mais importantes e as aves jovens precisam ser mantidas em ambiente satisfatório, especialmente no período de desenvolvimento da imunidade.

A utilização de vacinas como segunda intervenção na prevenção da DM é, na atualidade, uma prática comum na avicultura comercial, e tem por objetivos principais prevenir a doença clínica, lesões e mortalidade; preve-



As pintainhas são susceptíveis a infecção principalmente nas duas primeiras semanas de vida, quando a imunidade vacinal ainda não foi estabelecida.

nir a imunossupressão permanente; e reduzir as condecorações por lesões cutâneas ou viscerais no abatedouro.

No controle deve-se considerar que somente boas vacinas não são suficientes para controlar DM, e que a mutação e exposição precoce ao VDM e falhas nos programas de biossegurança são as situações mais prováveis para superar a proteção por vacinas. Em lotes comerciais a vacinação é usada como auxiliar para minimizar perdas clínicas como formação de tumores; entretanto, não bloqueia a excreção do vírus de campo nem impede a infecção. Por isso, as vacinas são aplicadas por via subcutânea no incubatório no dia do nascimento dos pintos ou administradas in ovo na transferência dos ovos da incubação para a eclosão - entre o 17º e 19º dia de incubação -, a fim de imunizar mais precocemente as aves antes do contato com os vírus de campo.

Todas as vacinas utilizadas atualmente são vacinas vivas, derivadas das três estirpes virais: a cepa HVTFC126, a cepa GaHV-3 SB-1 e da cepa de GaHV-2 CVI988/Rispens. HVT e SB-1 são vacinas consideradas heterólogas porque são derivadas de uma espécie viral diferente

daquela que o vírus se destina a proteger, enquanto a vacina Rispens é considerada homóloga porque é da mesma espécie viral como o vírus alvo.

As vacinas vivas modificadas são fundamentais nos programas de controle da DM e podem ser usadas individualmente ou combinadas: a) HVT (sorotipo 3); b) HVT + SB-1 (sorotipo 2); c) HVT + RISPENS (sorotipo 1 atenuado); d) RISPENS; e) RISPENS + SB-1.

Os diversos tipos de vacinas contra DM têm sido comparados para avaliar a eficácia de proteção entre diferentes combinações das amostras vacinais, e a combinação mais eficaz em reprodutoras tem sido demonstrada com as vacinas HVT + RISPENS, que têm oferecido maior grau de proteção contra desafios de amostras dos VDM patogênicos de campo.

Baigent *et al* (2006) demonstraram por meio da real-time PCR, uma correlação entre proteção e presença do vírus vacinal em penas de aves imunizadas com diferentes vacinas comerciais de CVI988.

As vacinas vetorizadas são um produto da engenharia

Eficácia das diferentes vacinas de Marek e combinações para uso em frangos de corte e galinhas de vida longa

Formulações mais frequentes de vacinas	Relativa eficácia x DMV patotipo			Uso em lotes comerciais	
	V	VV	VV+	Frangos	Matrizes e Postura
HVT FC 126 (sorotipo 3)	+++	+	+	+	+
HVT FC 126 (sor 3) + Sorotipo 2	+++	+++	++	+++	++
CVI988 (Rispens Sor 1) ou + Sor 3 ou + Sor 2 e 3	+++	+++	+++	+	+++

(adaptado de Witter, Sharma, Fadly, 1980)

genética e se desenvolveram a partir da inserção de genes de vírus num vetor viral. As vacinas recombinantes que existem no mercado são vacinas que utilizam HVT como vetor e são conhecidas normalmente como HVT recombinante ou rHVT. Atualmente existem quatro rHVT disponíveis comercialmente em alguns países: vetorizadas com genes do vírus da laringotraqueíte (rHVT-LT), genes do vírus de Newcastle (r- HVT-ND), gene do vírus da Influenza Aviária (rHVT-AI) e a última que expressa genes do vírus da doença infecciosa da bolsa (rHVT-IBDV). A imunidade gerada pelas vacinas vetorizadas tem sido suficiente para resistir aos desafios de vírus de campo. Devido à incompatibilidade na utilização de mais de uma vacina vetorizada com o mesmo vetor HVT, as pesquisas apontam um futuro próximo onde o mesmo vetor poderá carrear múltiplos genes contra diferentes enfermidades.

O desenvolvimento de uma vacina com estas características teve, entre outros objetivos, o de gerar um nível de imunidade suficiente para que as aves vacinadas fossem capazes de resistir ao desafio pelos vírus acima mencionados. Além disso, também se leva em conta durante seu desenvolvimento, evitar as reações pós-vacinais que acontecem com os vírus vivos, mas um dos aspectos que mais sobressaem é que com uma vacina recombinante (por exemplo, contra a LTI) evita-se a latência do vírus, vacinal ou de campo, quando se aloja no nervo trigêmeo, que provoca a doença quando sai desse estado latente.

Estudos recentes sobre a cinética da replicação do VDM em tecidos de aves vacinadas tem demonstrado uma tendência de se utilizar o VDM como vetor para expressar genes de proteção em diferentes doenças. Em fase experimental, existem vacinas que utilizam o sorotipo 1 como vetor. Estas vacinas se baseiam na se-

leção do oncogene meq em uma cepa muito virulenta (Md5). A vacina resultante é capaz de proteger contra desafios precoces com vírus da DM vv+.

A imunidade passiva é escassa na DM. Isso significa que pouca ou nenhuma carga de anticorpos maternos é transferida da matriz para a progênie através do ovo. À medida que o pinto não tem resistência natural ao VDM, não tem imunidade passiva e vai desenvolver gradualmente sua capacidade imunológica durante duas a três semanas de vida; devemos estimular a imunidade ativa (celular e humoral) através da vacinação e evitar neste intervalo o contato dos pintinhos com o vírus de campo, através de medidas higiênico-sanitárias.

Nos protocolos atuais de vacinação utilizados em diferentes partes do mundo, a questão da revacinação ainda permanece: revacinar ou não? Muitos países usam o booster, mas falta base científica para sustentar essa prática. Este tipo de vacinação tem aumentado nos últimos anos em reprodutoras e poedeiras, e diferentes protocolos de revacinação tem sido utilizados entre 1 dia de idade até aos 14 dias de idade.

Função completa do sistema imunológico das aves é importante na prevenção da DM. Doenças imunossupressoras tais como doença infecciosa da bolsa cloacal, vírus da leucose aviária, vírus da anemia infecciosa das galinhas e infecções por reovírus podem afetar a resposta imunológica adequada para vacinação da DM, ou favorecer o desenvolvimento e manutenção do vírus latente de campo nas aves. Vacinação e estratégias de controle para doenças imunossupressoras devem ser praticadas para minimizar a suscetibilidade à DM. Estresse causado por fatores de manejo ou ambientais também podem afetar a imunidade das aves vacinadas, tornando-as suscetíveis às infecções de campo.

Edição Especial

A imunidade desencadeada pela vacina vai auxiliar a combater a replicação do vírus de campo nos pintos, prevenindo o aparecimento de sinais clínicos. A vacina não impede totalmente a circulação do VDM de campo no lote.

Falhas de vacinação são frequentemente causadas por:

- Práticas inadequadas de vacinação: excesso de diluição da vacina; falhas no processo de armazenamento, descongelamento inadequado, aplicação incorreta, uso de antibióticos no diluente que alteram a viabilidade do vírus, entre outros.
- Práticas inadequadas de manejo: curto intervalo entre lotes, reúso de cama sem tratamento adequado, densidade muito elevada, lavagem insuficiente, desinfecção precária etc.
- Coinfecção com vírus imunossupressores, tais como o vírus de anemia infecciosa das galinhas e vírus da

doença infecciosa da bolsa, interferindo com respostas imunes mediadas por células.

Portanto, se ocorre um problema de doença de Marek, em primeiro lugar deve-se verificar se os procedimentos de vacinação e de manejo estão sendo realizados corretamente.

Outro método de controle é o desenvolvimento de linhagens comerciais de aves geneticamente resistentes ao VDM. O programa de seleção genética iniciou-se na década de 60 antes do advento das vacinas, e baseou-se na tipagem sanguínea de classe específica para genes do complexo de histocompatibilidade maior (CHM). Após a introdução da vacina de Marek HVT no início da década de 70, perdas por DM em frangos e poedeiras comerciais foram significativamente reduzidas e a indústria avícola adotou a vacinação como a principal estratégia de controle da DM. Atualmente, somente o uso de vacinas não oferece a melhor estratégia, sendo necessária a inclusão de uma boa base genética de resistência ao VDM, uma vez que existem



A vacinação é realizada no incubatório por via in-ovo ou subcutânea no primeiro dia de vida



Check list para verificação das condições de preparo e aplicação das vacinas

diferenças genéticas significativas entre linhagens que podem ser selecionadas dentro de um programa de melhoramento genético.

Em resumo, a exposição precoce ao VDM pode ser reduzida pela adoção de boas práticas de manejo; no entanto, encontrar soluções para a mutação do VDM é um dos problemas importantes para o controle da DM, que podem ser minimizados por vacinação polivalente; dose vacinal correta; e hospedeiros geneticamente resistentes ao VDM em linhagens comerciais. A vacinação continuará sendo o principal método de controle contra a DM no futuro. Novos tipos de vacinas deverão ser aperfeiçoados, provavelmente por biotecnologia, a fim de proteger contra o aparecimento de vírus de campo mais virulentos. Boas práticas de manejo, biossegurança, resistência genética das aves, e controle de doenças imunossupressoras reduzem os desafios do VDM no campo.

Apesar da alta eficácia das vacinas, a DM ainda é uma grande preocupação para indústria avícola porque além de continuar causando linfomas em nervos e vísceras, os vírus atuais são muito mais neurovirulentos, mais imunossupressores e capazes de induzir a doença em animais geneticamente resistentes e/ou vacinados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAIGENT, S.J.; SMITH, L. P.; CURRIE, R. J. W.; NAIR, V. K. Replication kinetics of Marek's disease vaccine virus in feathers and lymphoid tissues using PCR and virus isolation. *Journal of General Virology*, v. 86, p. 2989-2998, 2005.
- BIGGS, P.M.; NAIR, V. The long view: 40 years of Marek's disease research and Avian Pathology. *Avian Pathology*, v. 41, n. 1, p. 3-9, 2012.
- COUTEAUDIER, M.; DENESVRE, C. Marek's Disease Virus And Skin Interactions. *Veterinary Research*, v. 45, n. 36, p. 1-12, 2014.
- DAVISON, A.J. Evolution of the herpesviruses. *Veterinary Microbiology*, v.86, p.69-88, 2002.
- DAVISON, T.F., NAIR, V. *Marek's disease - an evolving problem*. Elsevier Academic Press, London. 2004.
- GIMENO, I.M. Marek's disease vaccines: a solution for today but a worry for tomorrow? *Vaccine*, 26S, C31-C41, 2008.
- GIMENO, I.M. Future strategies for controlling Marek's disease. In: *Marek's disease: an evolving problem*. Edited by Davison F, Nair V. London: Elsevier Academic Press; 2004. P. 186-199.
- GIMENO, I.M. Novedades sobre la enfermedad de Marek. *XIII Seminario Internacional de Patología y Producción Aviar*. Athens, Georgia, USA. Marzo 2014 - AviNews, Oct. - Nov. 2014. P.89-99.
- MORROW, C., FEHLER, F. Marek's disease a world-wide problem. In: Davison, T.F., Nair, V. (Eds.), *Marek's Disease: An Evolving Problem*. Elsevier Academic Press, London. 2004. P. 49-61.
- NAIR, V. Evolution of Marek's disease - a paradigm for incessant race between the pathogen and the host. *Vet. J.*, v. 170, p. 175-183, 2005.
- RISPENS, B. H.; VAN VLOTEN, J.; MASTENBROEK, N.; MAAS, H. J. L.; SCHAT, K. A. Control of Marek's disease in the Netherlands. I. Isolation of an avirulent Marek's disease virus (strain CVI 988) and its use in laboratory vaccination trials. *Avian Diseases*, v. 16, p. 108-125, 1972.
- SCHAT, K.A. Isolation of Marek's disease: revisited. *Avian Pathology*, v.34, p.91-95, 2005.
- SCHAT, K. A.; NAIR, V. Marek's Disease. In: *Diseases of Poultry*. Editor-in-chief, Y.M. Saif; associate editors, A.M. Fadly... [et al.]. 12th ed. 2008. p. 452 - 514.
- SCHAT, K.A. Marek's disease, a continuing problem. *XXII Latin American Poultry Congress 2011*.
- SHAHZAD, M.K.; MAJEED, K. A.; YOUNUS, M. Marek's Disease: A Mini-Review. *IJAVMS*, v.1, p. 4-8, 2007.
- SILVA, P.L. Doenças Neoplásicas em Aves Comerciais. In: *Saúde Aviária e Doenças*. Editora Roca. Capítulo 17, p. 154-167, 2007.
- SILVA, R.F.; DUNN, J.R.; CHENG, H.H.; NIKURA, M. A MEQ-deleted Marek's disease virus cloned as a bacterial artificial chromosome is a highly efficacious vaccine. *Avian Diseases*, v. 54, p. 862-869, 2010.
- SUDHAKAR, S. Vaccinal Control of Marek's Disease: The Present and Future - A Review. *J. World's Poult. Res.*, v. 2, n.4, p.73-78, 2012.
- SUDHAKAR, S.; NAIR, A. J. Marek's Disease: The Never Ending Challenge - A Review. *Int J Pharm Bio Sci*, v. 4, n. 2, p. 6 - 11, 2013.
- WALKDEN-BROWN, S.; ISLAM, A.; GROVES, P.; RUBITE, A.; SHARPE, S.M.; BURGESS, S. Development, application, and results of routine monitoring of Marek's disease virus in broiler house dust using real-time quantitative PCR. *Avian Diseases*, v. 57, p. 544-554, 2013.
- WITTER, R. L.; SHARMA, J. M.; FADLY, A. M. Pathogenicity of Variant Marek's Disease Virus Isolants in Vaccinated and Unvaccinated Chickens. *Avian Diseases*, v. 24, n. 1, p. 210-232, 1980.
- WITTER, R.L., GIMENO, I.M. Susceptibility of adult chickens, with and without prior vaccination, to challenge with Marek's disease virus. *Avian Diseases*, v. 50, p. 354-365, 2006.



O boletim Ceva World Edição Especial é uma publicação da Unidade de Negócios Aves e Suínos da Ceva Saúde Animal.

SEU FUTURO SERÁ BRILHANTE



VECTORMUNE® HVT IBD & RISPENS

Proteção forte e completa contra
doença de Marek e Gumboro

- Proteção forte contra vírus virulento da doença de Marek.
- Proteção contra vírus clássico e variante E da doença de Gumboro.
- Chick Program - completo serviço de vacinação Ceva.



Ceva Saúde Animal
Rua Manoel Joaquim Filho, 303 • Paulínia / SP
CEP 13148-115 • Tel: 55 (19) 3833-7726
www.ceva.com.br

Juntos, além da saúde animal

