

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente: Fernando Henrique Cardoso

Ministro da Agricultura e do Abastecimento: Francisco Turra

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA

Presidente: Alberto Duque Portugal

Diretores: Dante Daniel Giacomelli Scolari
Elza Ângela Battaggia Brito da Cunha
José Roberto Rodrigues Peres

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SUÍNOS E AVES - CNPSA

Chefe Geral: Dirceu João Duarte Talamini
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento de Suínos:
Paulo Roberto Souza da Silveira
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento de Aves:
Gilberto Silber Schmidt
Chefe Adjunto de Apoio Técnico e Administrativo:
Claudinei Lugarini

SIMPÓSIO SOBRE ONCOVÍRUS AVIÁRIOS

07 e 08/07/99 – Concórdia - SC

ANAIS

Embrapa

Suínos e Aves

Embrapa Suínos e Aves. Documentos, 60

ISSN – 0101-6245

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Suínos e Aves
Br 153 - Km 110 - Vila Tamanduá
Caixa Postal 21
89.700-000 - Concórdia - SC

Telefone: (049) 4428555

Fax: (049) 4428559

Tiragem: 300 exemplares

Tratamento Editorial: Tânia Maria Biavatti Celant

SIMPÓSIO SOBRE ONCOVÍRUS AVIÁRIOS, 1999,
Concórdia, SC. **Anais...** Concórdia: EMBRAPA-CNPISA,
1999. 46p. (EMBRAPA-CNPISA. Documentos, 60).

1. Ave-doença. 2. Oncovírus. I. Título. II.Série.

CDD 636.50896

©EMBRAPA - 1999

ORGANIZADORES

Liana Brentano
Janice Reis Ciacci Zanella
Gilberto Silber Schmidt

AGRADECIMENTOS

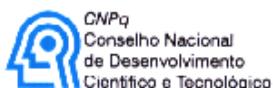
A Comissão Organizadora agradece a colaboração das Áreas Técnicas e de Apoio Técnico e Administrativo que contribuíram para a realização deste evento.

PROMOÇÃO E ORGANIZAÇÃO



Suínos e Aves

PATROCINADORES



APRESENTAÇÃO

A Embrapa Suínos e Aves está realizando o **Simpósio sobre Oncovírus Aviários** com o objetivo de reunir profissionais da agroindústria, universidades e institutos de pesquisa para atualização de conhecimentos na área de oncovirose aviária. Criar um fórum de discussão entre técnicos e pesquisadores do Brasil e do exterior para avaliar o atual quadro dessas doenças no país, definindo as demandas e linhas de pesquisa prioritárias.

A Comissão Organizadora

SUMÁRIO

Palestra	Pág.
WHAT IS NEW IN MAREK'S DISEASE? <i>Dr. K.A. Schat.....</i>	1
DOENÇA DE MAREK NO BRASIL <i>Dra. Nair Massako Katayama Ito.....</i>	9
SUBGROUP J AVIAN LEUKOSIS VIRUS-INDUCED MYELOID LEUKOSIS: RECENT DEVELOPMENTS IN PATHOGENESIS, DIAGNOSIS & CONTROL <i>Dr. K. Venugopal.....</i>	18
IMPACTO DA LEUCOSE AVIÁRIA NA PRODUÇÃO AVÍCOLA E ESTRATÉGIAS DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO <i>Dr. Paulo Lourenço da Silva.....</i>	21
RESULTADOS DE DIAGNÓSTICO DO VÍRUS DA LEUCOSE J EM LINHAS DE CORTE <i>Dra. Liana Brentano.....</i>	33
PATHOGENESIS OF CHICKEN INFECTIOUS ANEMIA VIRUS <i>Dr. Karel A. Schat, Dr. Carol J. Cardona and Dr. Carrie Markowski.....</i>	42

WHAT IS NEW IN MAREK'S DISEASE?

K.A. Schat, D.V.M., Ph.D.

Unit of Avian Health
Departments of Microbiology and Immunology
Cornell University, Ithaca NY 14853

Introduction

Marek's disease(MD)has remained a major problem for the poultry industry. New field strains emerge frequently causing vaccine failures. Therefore, improved vaccines need to be developed continuously. The development of improved vaccines will require a better understanding of MD immunity. In this paper, current vaccine strains, proper vaccination techniques and possible reasons for vaccine failures will be briefly reviewed. In addition, I will discuss new research on immune responses in my laboratory.

Vaccine strains

Three serotypes of MDV are recognized, serotype 1 and 2 can be isolated from chickens, while serotype 3 or herpesvirus of turkeys (HVT) is isolated from turkeys. All oncogenic strains belong to serotype 1, while serotype 2 and 3 viruses are naturally nononcogenic (Schat, 1985). During the early 1970's three types of Marek's disease (MD) vaccines were developed (Witter, 1992). The first one, HPRS-16/Att, was developed from an oncogenic, serotype 1 MD herpesvirus (MDV) by attenuation in chick kidney cell cultures. A second vaccine, CVI988, was also developed from a serotype 1 MDV strain but the original virus was of low oncogenicity. One of the main differences between HPRS-16/Att and CVI988 is that the latter will spread horizontally in contrast to the former. CVI988 is often referred to as the Rispens vaccine in honor of the late Dr. B.H. Rispens, who developed this vaccine with his co-workers. The third vaccine, HVT, prepared from a

related herpesvirus isolated from turkeys, has become the most widely used vaccine.

Although these vaccines provide exceptional levels of protection, vaccination breaks became more frequent during the early 1980's due to the emergence of vvMDV strains. The addition of SB-1, a serotype 2 MDV strain, to HVT significantly improved protection against challenge with vvMDV compared to HVT alone. Since then, several other serotype 2 strains (e.g., 301B, Z4) have become available. The recent emergence of vv+MDV strains (Calnek et al., 1998; Witter, 1997, 1998) has led to the increased use of trivalent combinations consisting of CVI988, HVT and SB-1. This is the second emergence of new strains since the introduction of the first MD vaccines suggesting that each type of vaccine can be used for 10 to 15 years before more virulent field strains emerge.

Proper use of Vaccines

All vaccine strains are used as cell-associated viruses, which are stored in liquid nitrogen, although HVT can also be used as a cell-free product. Proper preparation and use of the cell-associated vaccine are critical for optimal protection. The use of inappropriate temperatures to thaw the vaccine or the use of non-approved diluents may result in loss of titer and incomplete protection.

Chicks are either vaccinated by inoculation at one day of age or as 18-day-old embryos. *In ovo* vaccination has become automated and as a consequence vaccine delivery is probably less prone to errors than injection of one-day-old chicks. Field trials did not demonstrate an increased protection against MD, but overall production costs were improved by *in ovo* vaccination (Ricks et al, 1998). Perhaps the most important advantage of *in ovo* vaccination is the improved delivery of vaccine eliminating one of the most important reasons for vaccine failures.

Vaccine failures

Failures to protect at the expected level can be caused by many factors, such as poor vaccination techniques, high levels of stress, and infection with other viruses causing immunosuppression. Recent studies in my laboratory (Markowski et al., manuscript in preparation) have clearly shown that chicken infectious anemia virus (CIAV) can interfere with the development of cell-mediated immunity. This is especially important during the late breaks, because recent studies by Cardona et al (manuscript in preparation) and Schat et al (these proceedings) suggest that replication of CIAV may occur fairly frequently during the development of sexual maturity. However, vvMDV strains were responsible for some vaccine breaks during the early 1980's and even more virulent strains (vv+MDV) are emerging at the present time. Unfortunately, serotype 1 strains cannot be differentiated for virulence by serological or molecular techniques. In order to characterize new strains for increased virulence complex *in vivo* experiments are needed in which genetically susceptible and resistant chickens are vaccinated with a serotype 1 vaccine (e.g. CVI988), HVT or HVT + SB-1 (or 301B) followed by challenge with a standard vvMDV strain and the new strain(s). Challenge with vvMDV strains will cause MD in genetically susceptible birds vaccinated with HVT, but not in chickens vaccinated with CVI988 or bivalent vaccines (Witter et al., 1995). Genetically resistant birds are protected against challenge with vvMDV by vaccination with HVT. In order to be classified as more virulent than vvMDV a strain must cause a significant increase in MD compared to challenge with vvMDV.

Future vaccine developments

Although there are not yet wide-spread problems with the current trivalent vaccine combinations, complaints on vaccine failures are not uncommon. Unfortunately, there are few if any

new options available to improve the level of protection especially against the new strains with increased virulence.

The use of recombinant vaccines using fowlpox- or MDV serotype 1, 2, or 3 MDV-based vectors is certainly feasible (Zelnik, 1995). Selection of relevant genes for inclusion in these vaccines is still problematic, because there is a lack of knowledge on the importance of different MDV proteins for cell-mediated and humoral immunity. However, progress has been reported on the identification of MDV proteins that are important for cell-mediated immunity (see below). Identification of these proteins would allow the construction of recombinant vaccines expressing specific epitopes to stimulate humoral and cell-mediated immune responses.

Cell-mediated immunity

Identification of specific MDV proteins, recognized by cytotoxic T cells, has been problematic. We have developed a system in which reticuloendotheliosis virus (REV)-transformed, MHC-defined lymphoblastoid cell lines (RECC) are expressing individual MDV genes after stable transfection. These cell lines were selected because they are lysed by syngeneic but not allogeneic CTL from REV-infected chickens (Schat, 1996). The use of RECC lines as target cells in chromium release assays (CRA) and REV-specific CTL serves as a positive control to ascertain that transfection and expression of foreign genes in these cell lines do not interfere with antigen-processing pathways or MHC class I expression. Pratt et al (1992) and Uni et al (1994) showed that RECC lines transfected with MDV genome fragments can serve as target cells for the detection of MHC-restricted, MDV-specific CTL. Omar and Schat (1996) and Schat and Xing, submitted) expressed a number of MDV genes in RECC-CU91 (MHC: $B^{19}B^{19}$) and CU201 (MHC: $B^{21}B^{21}$) to determine which antigens can be detected by CTL from MDV-infected chickens (Table 1). The strongest specific release was

noted against cell lines expressing gB and the weakest against cell lines expressing the meq protein.

The difference in response to ICP4 expressing RECC lines with CTL from genetically susceptible P2a (MHC: $B^{19}B^{19}$) and genetically resistant N2a (MHC: $B^{21}B^{21}$) chickens is of interest. It is the first indication that genetic resistance could be linked, at least in part, to specific CTL responses. We are currently working on the identification of the epitopes recognized by CTL and have located the epitope for gB to a group of 100 amino acids.

Recently we learned that nitric oxide (NO) is produced in response to MDV infection. During immune responses NO is mainly produced in macrophages by inducible NO synthase (iNOS). Differences in induction levels of iNOS have been linked to specific genetic strains and may be correlated with MHC-defined genetic resistance to MDV. In vitro and in vivo data suggest that NO can inhibit replication of MDV (Xing and Schat a and b, manuscripts in preparation), thus providing an explanation for earlier work by others that macrophages are an important part of the immune responses to MD.

Conclusions

MD continues to be a problem. New vaccines are likely to be needed within the next five to ten years. The identification of epitopes for CTL recognition may lead to better vaccines. Improved genetic resistance by selection for immune responses e.g., ICP4-specific CTL and increased iNOS expression, need to be part of future protection strategies.

References

CALNEK BW, HARRIS RW, BUSCAGLIA C, SCHAT KA, LUCIO B. Relationship between the immunosuppressive potential

and the pathotype of Marek's disease virus isolates. *Avian Dis* 1998;42:124-132.

OMAR AR, SCHAT KA. Syngeneic Marek's disease virus (MDV)-specific cell-mediated immune responses against immediate early, late, and unique MDV proteins. *Virology* 1996;222:87-99.

PRATT WD, MORGAN R, SCHAT KA. Cell-mediated cytolysis of lymphoblastoid cells expressing Marek's disease virus-specific phosphoproteins. *Vet Microbiol* 1992;33: 93-99.

RICKS CA, AVAKIAN A, BRYAN T, GILDERSLEEVE R, HADDAD E, ILICH R, KING S, MURRAY L, PHELPS P, POSTON R; WHITFILL C, WILLIAMS C. In ovo vaccination technology. In: Schultz RD, *Veterinary Vaccines and Diagnostics*. *Adv Vet Med* 1999;41:495-515.

SCHAT KA. Characteristics of the virus. In: Marek's disease. *Scientific Basis and Methods of Control* (Payne LN, editor). Boston, Martinus Nijhoff Publishing. 1985:77-112.

SCHAT KA Immunity to Marek's disease, lymphoid leukosis and reticuloendotheliosis. In: Davison, F, Payne, L.N. Morris, T.R. editors. *Poultry Immunology*. Abingdon: Carfax Publishing Company, 1996:209-233.

UNI, Z, PRATT, W.D., MILLER, M.M., O'CONNELL, P.H., SCHAT, K.A. Syngeneic lysis of reticuloendotheliosis virus-transformed cell lines transfected with Marek's disease virus genes by virus-specific cytotoxic T cells. *Vet. Immun. Immunopath.* 1994;44: 57-94.

WITTER, R.L. Recent developments in the prevention and control of Marek's disease. *Proceedings XIX World's Poultry Congress*, 1992;Vol 1: 298-304.

WITTER, R.L. The changing landscape of Marek's disease. Avian Pathol 1998;27:S46-53.

WITTER, R.L. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. Avian Dis 1997;41:149-163.

WITTER, R.L, LEE, L.F. FADLY, A.M. Characteristics of CVI988/Rispens and R2/23, two prototype vaccine strains of serotype 1 Marek's disease virus. Avian Diseases 1995;39: 269-284.

ZELNIK, V. Marek's disease and new approaches to its control. Acta Virol 1995;39:53-63.

Table 1. Lysis of reticuloendotheliosis virus (REV)-transformed cell lines expressing Marek's disease virus (MDV) genes by syngeneic cytotoxic T cells from REV- and MDV-infected chickens (From Omar and Schat, 1996 and Schat and Xing, submitted^a).

MDV gene	MHC	Cell line	RT-PCR	Antigen	REV	MDV
none	$B^{19}B^{19}$	CU91 ^b	Neg	NT ^c	Pos	Neg
	$B^{\zeta 1}B^{\zeta 1}$	CU201 ^d	Neg	NT	Pos	Neg
pp38	$B^{19}B^{19}$	CU364	Pos	Pos	Pos	Pos
	$B^{\zeta 1}B^{\zeta 1}$	CU362	Pos	Pos	Pos	Pos
gB	$B^{19}B^{19}$	CU371	Pos	Pos	Pos	Pos
	$B^{\zeta 1}B^{\zeta 1}$	CU368	Pos	Pos	Pos	Pos
Meq	$B^{19}B^{19}$	CU363	Pos	Pos	Pos	Pos
	$B^{\zeta 1}B^{\zeta 1}$	CU369	Pos	Pos	Pos	Pos
ICP4	$B^{19}B^{19}$	CU373	Pos	NA ^d	Pos	Neg
	$B^{\zeta 1}B^{\zeta 1}$	CU375	Pos	NA	Pos	Pos
ICP22	$B^{19}B^{19}$	CU374	Pos	NA	Pos	Neg
	$B^{\zeta 1}B^{\zeta 1}$	CU378	Pos	NA	Pos	Neg
ORF-A41	$B^{19}B^{19}$	CU365	Pos	Pos	Pos	Neg
	$B^{\zeta 1}B^{\zeta 1}$	CU376	Pos	Pos	Pos	Neg
ORF-A	$B^{19}B^{19}$	CU370	Pos	NA	Pos	Neg
	$B^{\zeta 1}B^{\zeta 1}$	CU377	Pos	NA	Pos	Neg
ICP27 ^a	$B^{19}B^{19}$	Cu512	Pos	Pos	Pos	Pos
	$B^{\zeta 1}B^{\zeta 1}$	CU513	Pos	Pos	Pos	Pos
ORF-L1	$B^{19}B^{19}$	CU372	Pos	NA	Pos	Neg
	$B^{\zeta 1}B^{\zeta 1}$	CU367	Pos	NA	Pos	Neg

^b CU91 and CU201 were used as parent cell lines for the expression of MDV genes in a MHC. $B^{19}B^{19}$ and $B^{\zeta 1}B^{\zeta 1}$ background respectively.

^c Not tested ^d Specific antisera were not available.

DOENÇA DE MAREK NO BRASIL

Nair Massako Katayama Ito, Méd. Vet., D.Sc.

Patologia Aviária
SPAVE Consultoria em Produção e Saúde Animal Ltda
Rua Alvarenga Peixoto, 466 Vila Anastácio
Fone/ Fax: (011) 831-2984/ 261-6398
E-mail: spave@uol.com.br

Revisão

□ **Etiologia:** Herpesvírus (DNA vírus) classificado em 3 sorotipos:

Sorotipo 1: amostras virulentas e oncogênicas.

Sorotipo 2: amostra não oncogênica de galinhas.

Sorotipo 3: HVT (Herpesvírus de perus).

□ **Definição:** Doença neoplásica caracterizada pela ocorrência de tumores nas vísceras, pele e nervo periféricos, caracterizadas por uma proliferação anormal de linfócitos T, e indução de linfomas.

□ **Apresentação clínica:** quando uma ave é infectada por um vírus do tipo muito virulento da doença de Marek (vv MDV) temos um curso clínico em um plantel de aves que se caracteriza por:

- # **paralisia transitória:** ocorre 2 a 3 semanas após infecção e geralmente as aves morrem devido à competição, dificuldade de acesso aos comedouros, bebedouros e fome. As aves apresentam tremores de cabeça devido à ocorrência de encefalite.
 - # **problema de pernas:** ocorre 5 a 6 semanas após infecção e nota-se comprometimento dos nervos periféricos (neuroinfomatose periférica).
 - # **Caquexia, leucopenia progressiva** e tumores cutâneos e/ou viscerais aparecem após 7 a 10 semanas.
-

□ **Patogenia:** No campo, de modo geral, não se dá muita importância à patogenia da doença de Marek. Na atualidade, com o advento do uso de vacinas para o controle da enfermidade e aumento de exigências no controle sanitário, é importante considerar que, no curso da infecção pelo vírus virulento da doença de Marek, ocorrem os seguintes fenômenos:

-
- # **Imunossupressão:** no início (1 semana após contágio) o vírus diminui funções das células mononucleares e macrófagos e destrói linfócitos B da bolsa de Fabrício.
 - # **Encefalite:** na ausência de imunidade humoral sólida, o vírus após replicar-se na bolsa de Fabrício, em particular os vírus do tipo muito virulento, suplanta a barreira hematoencefálica e localiza-se no sistema nervoso central causando edema vasogênico, afluxo perivascular de células mononucleares e/ou linfóides, trombose e hemorragia (fase da paralisia transitória).
 - # **Paralisia dos nervos periféricos:** replicação do vírus nas fibras nervosas com desmielinização e afluxo de células mononucleares e/ou linfóides
-

causando, inicialmente, inflamação e/ou proliferação anormal de células linfóides (perda de pernas, torcicolo, asa caída, etc) caracterizando o quadro de neurite periférica.

Linfomas ou tumores: somente após ocorrer multiplicação viral no hospedeiros e indução de resposta imune celular (afluxo de células T) é que ocorre a proliferação neoplásica dos linfócitos T diferenciados. Nesta fase notamos linfomas viscerais, cutâneos e ainda nos nervos periféricos.

Excreção viral: durante todo o curso da infecção pode ocorrer multiplicação viral (citólítica) em vários tecidos, incluso folículo da pena, e eliminação de vírus infectante. A principal forma de eliminação do vírus parece ocorrer através da descamação da pele e penas.

Situação da Doença de Marek:

□ **Histórico no Brasil:** o histórico de ocorrência ou aumento de casos da doença de Marek no Brasil, na sua forma neoplásica, é semelhante àquela descrita no mundo. Como se sabe, o aumento de casos da neurolinfomatose causada pelo vírus da doença de Marek está relacionado com aumento da disseminação, contaminação ou contágio com vírus do tipo muito virulento (vv MDV) que superam a imunidade induzida pela cepa HVT (vírus não patogênico e oncogênico isolado de perus) do sorotipo 3, e cepa SB1 (vírus não patogênico isolado de galinhas do sorotipo 2). Este fenômeno, denominado de “quebra da vacinação” ocorreu no início da década de 1990 no Brasil, e foi responsável por muitos casos erroneamente denominados de “Marek tardia”, em poedeiras comerciais e reprodutoras pesadas. Aproximadamente em 1992/1993 foi introduzida no Brasil, a vacina do sorotipo 1, amostra CVI 988 (Rispens) e notada redução dos casos de neurolinfomatose. Ao final desta década podemos considerar que a doença está sob controle, porém emergente em algumas regiões ou segmentos da avicultura, mesmo utilizando-se a vacina Rispens.

□ **Casos clínicos no Brasil:** através de análise retrospectiva de casos clínicos que acompanhamos podemos dar o seguinte histórico:

Final 1970-início de 1980: doença endêmica em

poedeiras comerciais, reprodutoras pesadas e frangos de corte – fase de introdução da vacina HVT em poedeiras comerciais e reprodutoras pesadas com redução dos casos clínicos em todo o país. Em frangos de corte a vacinação era efetuada somente em granjas com rescidiva de casos e houve “confusão” com ocorrência de reticuloendoteliose em um determinado ano.

Final da década de 1980 e início de 1990: casos clínicos esporádicos, “quebra da vacinação do HVT” e confusão com leucose linfóide/mielóide, resultando na introdução e aumento de uso da vacina Rispens em meados da década de 1990 para poedeiras comerciais, e menos significante para reprodutoras comerciais. Vacinação crescente de frangos de corte com amostra HVT, concomitante com aumento da produção avícola no Brasil.

Fim da década de 1990: apesar da consolidação do uso da vacina Rispens, principalmente em poedeiras comerciais e HVT para frangos de corte tem ocorrido casos de linfomas nos três segmentos da avicultura.

□ Situação atual para casos de linfomas no Brasil (meados a fim da década de 1990)

- **Poedeiras comerciais:** em algumas regiões com prevalência elevada de perda de pernas e em outras, apenas aumento de casos de encefalite e perda de pernas e, em outros casos restritos a lotes de uma ou outra forma clínica.

- **Reprodutoras comerciais:** situação conturbada e confusa devido à ocorrência de leucose linfóide ou mielóide agravada por pouco acompanhamento e/ou real redução de casos de linfomas devido doença de Marek. Paralisia de pernas e encefalites podem estar subdiagnosticadas e contribuindo com

aumento de casos de imunossupressão e neoplasias do complexo sarcoma leucose linfóide.

• **Frangos de corte:** casos esporádicos de condenação de carcaça de frangos de corte e confusão diagnóstica com “síndrome do fígado e baço grande” (Big liver spleen – BLS) e/ou fase virêmica dos tumores causados pelo vírus do complexo sarcoma leucose linfóide. Avaliação de bolsa de Fabrícus sugere que existe infecção com vírus da doença de Marek e, aparentemente, existem casos subdiagnosticados de encefalite e perda de pernas.

□ **Avaliação da “temperatura” para Marek:** baseado em estudos experimentais realizados no períodos de 1990-1992 e 1998-1999 temos realizado e recomendado:

-
- avaliação histológica da condição da bolsas de Fabrícus.
 - quantificação e análise histológica de casos de perda de pernas e/ou encefalites precoces ou na recria.
 - análise de mortalidade em aves semi-adultas e adultas e colheita de material para exame histopatológico.
 - incidência de irite e/ou cegueira branca em aves adultas e estudo histológico.
-

□ **Conclusões preliminares sobre o aumento da incidência de Marek** ao final desta década: antes de considerar que pode estar ocorrendo “seleção” de cepas do tipo muito virulentas pelo uso de vacinas atenuadas do sorotipo 1, seria muito importante ponderar alguns fatores tais como:

Cepas vacinais:

- **Não vacinado com HVT:** caso que pode ocorrer com frango de corte e poderia estar associado com aumento do desafio natural.
- **Poedeiras e reprodutoras não vacinadas com cepa do sorotipo 1:** pode se aventar “quebra de vacinação” propiciado pelo alojamento de idade/linhagem múltipla e aumento de criações locais, tráfego de aves, etc.

Lotes vacinados:

- **HVT em frangos de corte:** vários fatores podem estar contribuindo com aumento, a médio/longo prazo, da contaminação pelo vírus virulento da doença da Marek:
 - # subdosagem excessiva da vacina/ imunidade adquirida marginal.
 - # exposição prematura antes da implantação da imunidade devido reutilização de cama, idade múltipla, higiene e desinfecção, desinsetização, aves caipiras ou outro tipo de ave, etc.
 - # erro da vacinação.
 - # resposta imune comprometida devido à preexistência de fator imunossupressivo (leucose linfóide, micotoxinas, Gumboro, etc).
 - # associação com anemia infecciosa.
 - # reticuloendoteliose (?).
 - # vacina forte de Gumboro x vacinação.
-

• **Poedeiras e reprodutoras com HVT + Rispens:** idem anterior, sendo importante considerar, para o futuro, o papel da resistência para Marek obtida através da seleção genética das aves.

- **Vacinas do futuro:??**

Nada poderá conter o vírus virulento da doença de Marek se não houver uma conscientização sobre boas práticas de biossegurança.

- **Limitação diagnóstica, diagnósticos diferenciais e exames complementares:** os exames virológicos e sorológicos são muito limitados no que diz respeito à aplicação prática, e em particular para o vírus da doença de Marek extremamente limitado. De modo geral, provas diagnósticas são realizadas através de exame histopatológico de órgãos com formações neoplásicas, baseada em uma chave diagnóstica que compreende exame de bolsa de Fabrício, nervos periféricos e formações tumorais e encontro de transformação neoplásica de células linfóides. No entanto, no que diz respeito ao diagnóstico da doença de Marek e diferenciação com outras enfermidades, e ainda avaliação epidemiológica da dispersão do vírus, notamos que existem muitas falhas e um certo nível de despreocupação. Podemos enumerar os seguintes pontos críticos:

Diagnóstico:

- ⇒ Amostragem e remessa de material adequado.
 - ⇒ Não existe prova sorológica.
 - ⇒ PCR – mais direcionado para análise de massas tumorais.
 - ⇒ Histológico: fase de linfomatose confunde-se com reticuloendoteliose e leucose mielóide.
-

Epidemiologia:

⇒ Não existe rotina de monitoria em particular da fase virêmica.

**SUBGROUP J AVIAN LEUKOSIS VIRUS-INDUCED
MYELOID LEUKOSIS: RECENT DEVELOPMENTS
IN PATHOGENESIS, DIAGNOSIS & CONTROL**

K. Venugopal, Ph.D.

Project Leader, Viral Oncogenesis Group
Institute for Animal Health, Compton
United Kingdom

Avian leukosis viruses (ALV) belonging to subgroups A to E have been a major disease problem, causing great economic

loss to the poultry industry. As a result of the implementation of eradication programmes, the incidence of ALV-induced neoplastic diseases have declined to very low levels in the last 30 years. However, the sudden emergence of a new ALV producing myeloid leukosis has changed this scenario and once again ALV is threatening the commercial poultry industry. This new ALV strain was isolated by Dr. Payne's group at the Institute for Animal Health in United Kingdom from commercial meat-type chickens. Viral interference and neutralisation assays, as well as the host range analysis suggested that this isolate was distinct from the previously known subgroups A to I. This new isolate was placed in a new subgroup J, with HPRS-103 as the prototype virus. Further molecular studies showed that the gag and the pol genes of HPRS-103 were closely identical to those of other subgroups, but the env gene had far less sequence identity. However, the envelope sequences had over 96% homology to the env-like sequences of a novel subfamily of endogenous retroviral elements, designated EAV-HP present in the genome of all chicken lines. These findings suggested that HPRS-103 might have evolved by recombination between exogenous ALV and EAV-HP sequences.

ALV-J showed several distinct characteristics. Compared to the more common ALV subgroups A and B that mostly produce lymphoid leukosis, ALV-J is predominantly associated with myeloid leukosis, probably due to their increased tropism for the myeloid cells compared to the lymphoid cells. While different chicken lines show distinct differences in genetic susceptibility to subgroups A to E, no such differences seem to exist for ALV-J. However, among the 12 species of poultry and game birds, only the cells from turkey, chickens and ancestral jungle fowls supported the virus infection. Compared to the layers, meat-type chickens are more prone to develop tolerant viraemic infection and tumours.

ALV-J induced disease has spread very rapidly throughout the world in the last few years and has become a serious problem facing the poultry meat industry. The virus shows extensive

antigenic variation associated with sequence changes in the envelope resulting in escape from neutralisation. Similarly the spectrum of the disease in terms of the types of tumours induced are also showing variations in the naturally infected flocks. The infection status of the birds in the ALV-infected flocks differ according to the presence (+) or absence (-) of viraemia (V), serum antibodies (S) and the group-specific antigen (GSA) in the cloacal or vaginal swabs (S). Generally the embryonic infection results in tolerant viraemic shedders (V+A-S+) and post-hatch infection leads to immune non-shedders (V-A+S-). However in meat-type birds, the post-hatch infection could lead to viraemic shedders (V+A-S+) or immune shedders (V-A+S+). The shedders can congenitally transmit ALV to their progeny and eradication programs mainly focus in their removal.

Diagnosis of ALV-J can be made by the identification of the gross tumours and histology. However, the confirmation of diagnosis can be made by the isolation of the virus from materials such as tumours, serum or cloacal/vaginal swabs in tissue culture. C/E (chickens resistant to subgroup E) chicken embryo fibroblasts can be used for growing the virus. GSA ELISA of cell extracts detects evidence of virus growth. GSA ELISA is also used to detect the virus in the cloacal swabs and albumen and is an important test in the eradication programs. Detection of ALV-J-specific antibodies in the serum is often useful to monitor the infection status of flocks. This can be done either by ELISA using recombinant gp85 envelope glycoprotein-coated plates or by neutralisation tests. ALV-J specific PCR tests is also a valuable adjunct to the conventional diagnostic methods.

Eradication of the disease is achieved mainly removing the infected birds so that the spread of the disease can be prevented. As the horizontal spread of the disease is more efficient compared to other subgroups, there is need to implement the eradication programs more rigorously. The eradication programs in pedigree birds involve the cloacal swab testing at 20 weeks, antibody and viraemia testing at 22 weeks, egg albumen testing on the first two eggs at 23 weeks, meconium

testing at 26 weeks and the egg albumen testing at 40 weeks. Any of the birds if found positive at any stage will have to be rejected. Other methods of control such as the use of vaccines are also being attempted.

IMPACTO DA LEUCOSE AVIÁRIA NA PRODUÇÃO AVÍCOLA E ESTRATÉGIAS DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO

Paulo Lourenço da Silva, Méd. Vet.

Granja Rezende, UFU
Uberlândia, MG.
paulol@rezendealimentos.com.br

Introdução

A leucose aviária é causada pelo vírus da leucose aviária (VLA) e foi descrita há aproximadamente 100 anos. Galinhas são os hospedeiros naturais para o VLA, embora tipos do vírus tenham sido isolados de faisões, perdizes e codornas. Os retrovírus do grupo leucose/sarcoma aviário induzem a uma variedade de tumores nas espécies aviárias acometendo células hematopoéticas das séries eritróide, linfóide e mielóide, e levando desenvolvimento de tumores de ovário, rim, testículo, fígado, pâncreas e sistema nervoso. A infecção pelo VLA é de

grande importância econômica porque além dos tumores, causa efeitos negativos, sobre a produção de ovos, mortalidade, eclodibilidade e ganhos genéticos. O VLA é transmitido congenitamente ou por contato, e ocorre em quase todos os lotes de reprodutoras em todo o mundo. Estresse ou imunossupressão pode aumentar a susceptibilidade das aves para infecção pelo VLA e estado de portador. O vírus da leucose aviária subgrupo J é um retrovírus associado com a leucose mielóide e, atualmente apresenta-se disseminado em vários países, inclusive no Brasil.

O principal objetivo deste artigo é salientar o impacto econômico da leucose aviária sobre a mortalidade e os efeitos da infecção subclínica sobre a performance dos lotes de reprodutoras pesadas, bem como estratégias de controle e erradicação da doença, a fim de se produzir aves livres da infecção pelo VLA.

Vírus da Leucose Aviária

Membros do grupo leucose/sarcoma de retrovírus aviários são atualmente classificados em um gênero denominado "VLA-relacionados" na família Retroviridae.

Os vírus da família Retroviridae são caracterizados por exclusivo método de reprodução. A replicação viral é caracterizada pela formação de um provírus DNA sob a direção da enzima transcriptase reversa, que integra-se ao DNA da célula hospedeira. Isto possibilita a transcrição do RNA viral, o qual é traduzido para produzir as proteínas virais que constituem o viriôn.

Os retrovírus do grupo leucose/sarcoma aviário podem induzir a ocorrência ou agravamento de infecções secundárias e oportunistas, decorrentes da imunossupressão causada pela severa destruição ou perda da função de células do sistema imune.

Os vírus do grupo leucose/sarcoma aviário que ocorrem em galinhas têm sido classificados dentro de 6 subgrupos A, B, C, D, E e J. Com base nos mecanismos naturais de transmissão, VLA podem ser classificados em exógenos (subgrupos A, B, C, D e J) e endógenos (subgrupo E). Os subgrupos A e B causaram grandes perdas por leucose linfóide em linhagens de postura nas décadas de 70 e 80, e programas de erradicação bem sucedidos reduziram o impacto da leucose na indústria avícola. Os subgrupos C e D raramente têm sido reportados no campo. PAYNE et alli (1989) identificaram casos de tumores mielóides em reprodutoras pesadas, dos quais foi isolado um VLA que não correspondia a nenhum dos outros subgrupos conhecidos, sendo classificado em um novo subgrupo de envelope, denominado J, e tem sido considerado como a infecção mais comum por retrovírus, sendo todas as linhagens de reprodutoras pesadas susceptíveis à infecção. O gene do envelope do VLA-J é relacionado proximamente com as seqüências endógenas de retrovírus endógenos presentes no genoma de reprodutoras normais, sugerindo que o subgrupo J é um recombinante gênico. Os estudos de sequenciamento do gene do envelope de vários isolados de campo de VLA-J indicam a ocorrência de mutações freqüentes levando a variações antigênicas.

Aspectos epidemiológicos da infecção pelo VLA-J

Nos últimos anos, o VLA-J tem sido associado com mielocitomatose em reprodutoras pesadas e frangos de corte em muitas partes do mundo, inclusive no Brasil.

Evidências sorológicas têm demonstrado o VLA-J como patógeno de preocupação atual para linhagens genéticas de reprodutoras pesadas, as quais parecem ser mais susceptíveis do que poedeiras comerciais do tipo leghorn brancas. Todas as linhagens de reprodutoras pesadas são susceptíveis à infecção pelo VLA-J; entretanto, a incidência tumoral varia de maneira

acentuada entre as linhagens. Estudos realizados no Brasil demonstraram que todas as linhagens de corte analisadas (4 das mais importantes em volumes de comercialização no País), observou-se a ocorrência do VLA-J, no entanto, as prevalências do vírus J foram significativamente diferentes entre linhagens.

Um dos grandes desafios no controle do VLA-J é a eficiência da sua transmissão. O subgrupo J dissemina-se mais rapidamente do que os outros subgrupos do VLA. Casos de prevalência inicial inferior a 5%, ultrapassaram, na idade adulta, índices de 25% a 70%, indicando a importância da transmissão horizontal. Pintos são infectados pelo VLA congenitamente, através do ovo (transmissão vertical), resultando pintos virêmicos imunotolerantes, ou pelo contato direto com aves infectadas (transmissão horizontal). Após infecção, aves susceptíveis produzem grandes quantidades de vírus em muitos tecidos sem aparentes efeitos prejudiciais. Aves infectadas congenitamente são mais susceptíveis ao desenvolvimento de neoplasias do que aves infectadas por contato.

Patogenia do VLA-J

Os subgrupos A e B têm como alvo as células B da bursa de Fabrício e produzem tumores linfóides, enquanto o subgrupo J possui um alto tropismo por células mielomonocíticas, que surgem da medula óssea produzindo tumores mielóides, e baixo tropismo por células da bursa de Fabrício.

Na leucose mielóide, as células mielóides são transformadas e permanecem latentes até a maturidade sexual da ave (16 a 22 semanas), quando a divisão celular se inicia e adquire características neoplásicas, disseminando-se para a superfície dos ossos, particularmente junções costocodrais, costelas, esterno, vértebras, pélvis e, infiltração em órgãos viscerais principalmente fígado, baço, rins, ovário, mesentério, pulmões, traquéia e laringe. O mecanismo molecular para

indução da doença, de ocorrência natural, ainda não é bem conhecido.

Geralmente a doença não ocorre até que aves atinjam a maturidade sexual, contudo, há relatos mais recentes do aparecimento de leucose mielóide também em aves com menos de seis semanas de idade, indicando que o vírus J, de forma ainda não esclarecida, tem a capacidade de induzir formas agudas da doença. Dentre as hipóteses que devem ser investigadas estão a ocorrência da inserção de um oncogene ou genoma de novas amostras de vírus J, ou de seqüências capazes de transdução de algum oncogene celular ainda desconhecido.

Impacto econômico do VLA-J na produção avícola

O verdadeiro significado econômico da infecção pelo VLA-J ainda não está completamente estabelecido; entretanto, a performance das reprodutoras pode estar comprometida devido a mortalidade elevada, imunossupressão e doenças concomitantes. O VLA subgrupo J tem sido associado a perdas econômicas significativas em reprodutoras pesadas em muitos países, incluindo o Brasil.

Nas condições de campo, há evidências de que outras doenças e fatores ligados ao manejo podem influenciar as características de produção de lotes infectados pelo VLA-J, além de que sua patogenicidade em reprodutoras pesadas é muito variável. O VLA-J poderá estar presente em diferentes populações de aves reprodutoras, não havendo tumores, mortalidade e interferência negativa no desempenho zootécnico dos lotes.

Infecções subclínicas de galinhas com VLA exógeno têm sido associadas com atraso na maturidade sexual, redução na produção de ovos, peso do ovo, espessura da casca dos ovos, fertilidade, eclodibilidade e peso corporal. Além disso, infecção

com VLA exógenos resulta em um aumento significativo na taxa de mortalidade total.

Pesquisas recentes têm demonstrado em lotes infectados pelo VLA-J que a produção de ovos pequenos tem aumentado. VLA-J têm contribuído para aumentar mortalidade entre o início até o pico de produção de ovos, podendo atingir 6% ou mais por mês. Em geral, na metade desta mortalidade pode-se observar lesões macroscópicas. Nos machos freqüentemente observa-se lesões típicas sobre a superfície interna dos ossos do peito e na área pélvica.

A queda na produção de ovos muitas vezes é evidente quando a produção de ovos é calculada sobre o número de ovos incubáveis por galinha alojada. Em lotes não infectados têm sido observado uma produção extra de 4 ovos por galinha às 36 semanas de idade. Mortalidade de 30% não são raras e quedas na produção de 10 ovos ou mais por ave alojada pode ser esperada em lotes infectados pelo VLA-J.

Cerca de 30% dos pintos comerciais podem estar verticalmente infectados no 1º dia de idade e não ter anticorpos protetores. Pintos pequenos parecem ser de maior risco. Mortalidade nas duas primeiras semanas de vida pode ser 3 a 4 vezes maior que a mortalidade normal com os pintos menores, com uma taxa de crescimento reduzida.

Comparação entre lotes de frangos de corte provenientes de reprodutoras positivas e negativas sugerem que o estresse da viremia pode causar taxa de crescimento reduzida com maior conversão alimentar entre 0,05 e 0,15, empenamento anormal e desuniformidade nos lotes infectados, embora em condições de campo, lotes "irmãos" podem não comportar-se similarmente. Existem interações do VLA-J com o meio ambiente e desafios de outras doenças, como por exemplo doença de Gumboro, que podem agravar os efeitos do vírus.

Métodos diagnósticos disponíveis para VLA

O diagnóstico de retrovírus do grupo VLA tem sido um grande desafio enfrentado pela indústria avícola, pela dificuldade de diagnosticar de forma rápida e precisa qual a ave está infectada com o vírus.

Os métodos atuais usados para detecção do VLA incluem um teste de ELISA para detecção de antígeno grupo específico. Este teste não é específico para VLA-J, uma vez que todos os subgrupos do VLA possuem em comum a proteína viral específica p27. Esta proteína é o principal componente do capsídeo viral e, portanto, a única interpretação correta de um resultado de teste ELISA direto é que p27 está presente nesta amostra, não havendo forma de sabermos por este teste qual é a fonte de p27. No entanto, este teste pode ser útil para detectar aves portadoras de VLA, sendo usado em programas de erradicação.

A tecnologia de diagnóstico disponível mais sensível e específica, capaz de diferenciar VLA endógenos e exógenos, é o isolamento viral em cultivo de fibroblastos do fenótipo C/E, os quais não permitem que vírus endógenos se repliquem. O isolamento do vírus nestas células não determina qual o vírus exógeno isolado, mas isto não é importante, uma vez que qualquer programa de erradicação deve ser direcionado para erradicar todos os vírus exógenos. Os principais problemas associados com esta técnica têm sido a falta de laboratórios equipados para manipular grandes quantidades de amostras, custo do teste e o tempo para resultados (em torno de 10 dias, tempo suficiente para o vírus se disseminar).

A técnica de PCR (reação de polimerase em cadeia) permite o diagnóstico do vírus no soro, células brancas do sangue e órgãos, e a caracterização do subgrupo viral depende do grupo de primers escolhidos para amplificação do genoma viral (RNA ou DNA do provírus). No entanto, existem evidências da ocorrência de variantes genéticas e antigênicas entre amostras isoladas do vírus J, o que sugere a capacidade de

mutação e recombinações no subgrupo J, sendo que o PCR pode não detectar todos os subtipos diferentes do vírus J.

Outro teste disponível é para detecção de anticorpos para VLA dos subgrupos A e B baseados em ELISA. Atualmente, há um teste de ELISA para anticorpos específicos para subgrupo J, disponível em dois laboratórios de referência nos Estados Unidos. Nos programas de erradicação, o teste de anticorpos não tem utilidade porque a erradicação depende da detecção de aves positivas ao vírus que possuem anticorpos negativos. No entanto, o teste poderia ser útil como ferramenta de monitoria para determinar se uma população de aves está realmente livre de vírus exógeno.

Métodos de controle da infecção pelo VLA-J

A variabilidade genética e a diversidade molecular dentro dos tipos de VLA-J reduzem a possibilidade de desenvolvimento de uma vacina eficiente e, portanto, a melhor estratégia para reduzir a ameaça de infecção é sua erradicação dos plantéis de elite e biossegurança.

Programas de erradicação estabelecidos para lotes infectados foram bem sucedidos com vírus dos subgrupos A e B e têm sido utilizados em esquemas de erradicação do vírus J. No entanto, existe a possibilidade de que reprodutoras negativas nos testes de ELISA em swabs de cloaca e albumina do ovo transmitir o vírus pela via vertical, o que poderá dificultar a completa erradicação do vírus da leucose. Os programas de erradicação devem ser dirigidos para a prevenção da transmissão vertical do VLA baseados na eliminação de aves positivas através de métodos adicionais de diagnóstico como isolamento viral e PCR, em associação a testes freqüentes de ELISA para p27, em diferentes fases da produção e em diferentes tipos de amostras.

Experiências de campo confirmam que medidas preventivas e práticas de manejo minimizam o impacto da infecção pelo VLA-J, as quais incluem: (a) adequado programa

de vacinação contra doença de Marek; (b) garantir níveis elevados de imunidade materna contra reovírus, gumboro e anemia infecciosa das galinhas, visando reduzir ou atrasar os desafios de campo; (c) controle de coccidiose aviária e outras infecções parasitárias; (d) controle da qualidade do alimento. Higiene e desinfecção são fatores críticos na prevenção de infecção pelo VLA-J.

Novas técnicas e testes estão sendo desenvolvidos em laboratórios de pesquisa, utilizando metodologias rápidas e eficientes para detecção direta e específica do VLA-J, as quais permitirão a melhor compreensão da infecção e doença e, no futuro, melhorar os procedimentos de diagnóstico e os programas de erradicação deste vírus.

Referências

- BRENTANO, L., ZANELLA, J. R. C. Leucose aviária subgrupo J: importância e diferentes metodologias para o diagnóstico e erradicação. *Avicultura Industrial*, março, p. 34-36, 1999.
- FADLY, A. M. Myelocytomatosis: an emerging disease of broiler breeder chickens. In: *PROCEEDINGS OF THE FORTY-SEVENTH WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE*. Sacramento. 1998. p. 43-45.
- FADLY, A. M., SMITH, E. J. An overview of subgroup J - like avian leukosis virus infection in broiler breeder flocks in the United States. In: *AVIAN TUMOR VIRUSES SYMPOSIUM*. Reno: AAPP, 1997. p. 54-57.
- FONSECA, A. S. K., IKUTA, N., LUNGE, V. R., MARQUES, E. K., GARCIA, M. Estudo da prevalência do vírus da leucose aviária - subgrupo J – em linhagens comerciais de corte. In:

CONFERÊNCIA APINCO 99 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. Prêmio José Maria Lamas da Silva. Anais... Campinas: FACTA, 1999. p. 81.

GAVORA, J. S., SPENCER, J. L.; GOWE, R. S.; HARRIS, D. L. Lymphoid leukosis virus infection: Effects on production and mortality and consequences in selection for high egg production. *Poultry Sci*, V. 59, p. 2165-2178, 1980.

GAVORA, J. S. Influence of avian leukosis virus infection on production and mortality and the role of genetic selection in the control of lymphoid leukosis. In: DE BOER, G. F. *Avian leukosis*. Boston: Martinus Nijhoff Publishing, 1987. p. 241-260.

GAVORA, J. S., KUHNLEIN, U., CRITTENDEN, L. B., SPENCER, J. L., SABOUR, M. P. Endogenous viral genes: association with reduced egg production rate and egg size in white leghorns. *Poultry Sci*. v. 70, p. 618-623, 1991.

KREAGER, K. S. Chicken industry strategies for control of tumor virus infections. *Poultry Science*, v. 77, p. 1213-1216, 1998.

MAIERS, J. J strain impact on broilers. *Canada Poultryman*, v. 86, n. 1, p. 11-12, 1999.

OWEN, R. L. Avian Leukosis Viruses - A diagnostic challenge. Technical report - Hubbard ISA. November. 1998. 4p.

PAYNE, L. N. Leukosis/sarcoma. In: JORDAN, F. T. W., PATTISON, M. *Poultry Dis*, 4. ed. London: Saunders, 1996. p. 123-133.

PAYNE, L. N. Retrovirus - induced disease in poultry. *Poultry Science*, v. 77, p. 1204-1212, 1998.

PAYNE, L. N. Leucosis in context. *Internat Hatch Pract*, v. 2, n. 4, p. 27-31, 1998.

- PAYNE, L. N., FADLY, A. M. Leukosis/sarcoma group. In: CALNEK, B. W., BARNES, H. J., BEARD, C. W., McDOUGALD, L. R., SAIF, Y. M. Diseases of Poultry. 10 ed. Ames. Iowa State University Press. 1997. p. 414-466.
- PAYNE, L. N., HOWES, K., SMITH, L. M., VENUGOPAL, K. Current status of diagnosis, epidemiology and control of ALV-J. In: AVIAN TUMOR VIRUSES SYMPOSIUM. Reno: AAPP, 1997. p. 58-62.
- PRIMARY BREEDERS VETERINARY ROUNDTABLE. Managing breeder flocks at risk infection with Avian Leukosis Virus Subgroup J (ALV-J). In: INTERNATIONAL POULTRY EXPOSITION. IDEXX SEMINAR PROCEEDINGS. Atlanta. 1998. Section III.
- SILVA, P. L. Procedimentos básicos para redução dos riscos de transmissão do vírus da leucose aviária, subgrupo J (VLA-J). In: SIMPÓSIO TÉCNICO SOBRE INCUBAÇÃO. Concórdia: EMBRAPA, 1998. p.45-56.
- SILVA, P. L. Novas perspectivas no controle de doenças virais imunossupressoras: Doença de Marek e Complexo Leucótico Aviário. In: CONFERÊNCIA APINCO 1999 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. Anais... Campinas: FACTA, 1999. p. 53-65.
- SILVA, P. L. Leucose mielóide aviária: uma revisão. Veterinária Notícias, v. 6, 13 p. 2000. (aceito para publicação).
- SPENCER, J. L. An overview of problems and progress in control of avian leukosis. In: AVIAN TUMOR VIRUSES SYMPOSIUM. Reno: AAAP, 1997. p. 48-53.

STEVENS, S. ALV-J. Canada Poultryman, v. 86, n. 1, p. 11, 1999.

ZAVALA, G. A novel leukosis virus threatens the industry. World Poultry, v. 14, p. 1, 1998.

ZAVALA, G. An overview of myeloid leukosis in meat type chickens. The Poultry Informed Professional. Published by the University of Georgia. 1998. 4p.

ZAVALA, G. Field strategies for control of ALV-J transmission and expression. The Primary Breeders Veterinary Roundtable Bulletin. n. 2, 1998. 6p.

ZAVALA, G. Myeloid Leukosis: A new and evolving virus disease of meat type chickens. In: INTERNATIONAL POULTRY EXPOSITION. IDEXX SEMINAR PROCEEDINGS. Atlanta. January 21, 1998. Section I.

ZAVALA, G. Update on myeloid leukosis in meat type chickens. In: INTERNATIONAL POULTRY EXPOSITION. IDEXX SEMINAR PROCEEDINGS. Atlanta. January 21, 1998. Section II.

RESULTADOS DE DIAGNÓSTICO DO VÍRUS DA LEUCOSE J EM LINHAS DE CORTE

Liana Brentano, Méd. Vet., Ph.D.

Embrapa Suínos e Aves
Caixa Postal 21
89700-000, Concórdia, SC
e-mail: liana@cnpesa.embrapa.br

Métodos de diagnóstico do vírus da leucose aviária (ALV)

O diagnóstico virológico da leucose é imprescindível para obter-se uma identificação precisa da ocorrência da doença e

adoção de medidas de biosegurança, controle de fatores ambientais, infecções secundárias, manejo nutricional entre outras variáveis já reconhecidas por exacerbarem os quadros clínicos de leucose. As diferentes ferramentas disponíveis para o diagnóstico do vírus são também essenciais principalmente para identificação e remoção de aves infectadas pelo ALV em programas de erradicação do vírus no material genético.

O diagnóstico das lesões macro e microscópicas compatíveis com leucose deve preferencialmente ser sempre confirmado através do diagnóstico virológico, por técnicas tais como o isolamento viral ou PCR, aliados à identificação também do subgrupo do ALV que associado à patologia da doença. A identificação do vírus é também importante para um diagnóstico diferencial mais seguro de outras patologias nas quais pode haver confundimento dos quadros clínicos e lesões, tais como na doença de Marek ou Reticuloendoteliose.

Métodos de diagnóstico do ALV

Uma das técnicas largamente aplicada em programas de erradicação da leucose aviária é o teste imunoenzimático de ELISA para p27, ou chamado também de teste de GSA (Antígeno Grupo específico). Este ELISA detecta a presença da proteína p27, que é uma proteína interna do ALV, presente em todos os diferentes subgrupos ALV. Por se basear na detecção de uma proteína comum a todos ALV, o ELISA para p27 não permite determinar o subgrupo viral que a ave está infectada e portanto detecta também ALV endógenos que são vírus do subgrupo E presentes em aves normais **(3)**. O diagnóstico de aves portadoras de vírus endógenos tem como desvantagem elevar significativamente os custos de programas de erradicação devido a eliminação de material genético que pode nestes casos não ser portador de vírus patogênicos tais como o ALV-J em linhagens de corte. As amostras utilizadas para detectar aves

infectadas e portanto potenciais transmissoras do vírus são a albumina do ovo de matrizes na fase de postura, swabs de cloaca e mecônio de pintinhos. Porém este teste de ELISA p27 não é recomendado para diagnóstico de viremia em amostras de soro devido a reações inespecíficas que podem ocorrer com estas amostras. Deve-se também levar em conta a possibilidade de resultados falso-negativos no teste de ELISA p27, uma vez que já foram descritas aves infectadas com subgrupo A do ALV onde 3% resultaram negativas para a p27 na albumina, apesar de evidência da transmissão do vírus para o embrião, detectada por ELISA no mecônio da progênie **(8)**. Portanto, programas de erradicação devem contemplar repetidos testes para p27, realizados com frequências determinadas, em diferentes amostras nas diferentes fases da produção para garantir a detecção e eliminação das aves infectadas pelo ALV.

Como alternativa e em associação ao teste de ELISA para p27, pode ser feito isolamento viral em cultivo de fibroblastos do fenótipo C/E, uma vez que células desta linhagem de aves não permitem o isolamento de vírus endógenos, permitindo a realização de um diagnóstico específico para vírus exógenos. O vírus da leucose não causa efeito citopático na célula infectada e deste modo é necessário realizar um teste complementar para detectar a presença do vírus ou não nas células. A identificação das culturas de fibroblastos onde foi isolado o vírus é então realizada através do teste de ELISA p27 preferencialmente, ou por teste de imunofluorescência. A vantagem do isolamento do vírus em cultivo celular frente o diagnóstico direto apenas por ELISA é poder também determinar qual o subgrupo do vírus isolado através de um subsequente teste de soroneutralização cruzada entre a amostra de vírus isolado em fibroblastos C/E, com antisoros específicos a cada subgrupo conhecido dos vírus de leucose aviária, com exceção dos subgrupo B e D que apresentam reação cruzada entre si.

PCR para diagnóstico do ALV-J

A técnica de PCR (reação de polimerase em cadeia) permite o diagnóstico do ALV através da detecção do RNA viral no soro, células brancas do sangue e órgãos, ou do provírus, que é o DNA produzido na fase de síntese viral e que pode estar integrado ao genoma de células do sangue e tecidos de aves infectadas pelo ALV. O PCR permite o rápido diagnóstico e determinação do subgrupo do ALV conforme os pares de primers definidos para amplificação do genoma viral (RNA ou DNA do provírus).

O ALV-J surgiu de uma recombinação de vírus endógeno e vírus exógeno **(1)**, e já há evidências da ocorrência de variantes genéticas e antigênicas dentro do subgrupo J do ALV **(7)**. A ocorrência de variantes sugere uma importante pressão de mutação do ALV-J, um aspecto importante a ser avaliado tanto na observância do aparecimento de novos quadros da doença, bem como no delineamento de métodos de diagnóstico. Há no genoma do vírus J uma seqüência conhecida como elemento E, que juntamente com uma seqüência dos retrovírus conhecida como LTR é utilizada por Fadly e colaboradores (USDA em Michigan, Estados Unidos) para diagnóstico específico do vírus J **(5)**. Outro PCR descrito para o diagnóstico do ALV-J se baseia na amplificação de uma seqüência do gene da proteína gp85 do envelope viral **(4)**. Contudo, isolamento viral positivo para o vírus J mas com resultados de PCR negativo na amplificação de seqüências do elemento E ou gp85, sugerem cautela no diagnóstico do ALV exclusivamente por PCR, uma vez que podem refletir o surgimento de variantes não detectáveis dependendo do delineamento dos primers aplicados ao diagnóstico por PCR.

Diagnóstico sorológico do ALV-J

Há um teste de ELISA para anticorpos contra gp85 baseado em um antígeno recombinante da proteína gp85 expressa em baculovírus, desenvolvido por Venugopal e

colaboradores na Inglaterra **(6)**. A transmissão vertical do ALV induz a um estado de imunotolerância, sem resposta de anticorpos mantendo-se uma viremia e excreção viral, enquanto que a infecção horizontal resulta em resposta imune. Apesar de que por um lado a presença de anticorpos conferem proteção contra o ALV no lote, não podem ser descartadas a possibilidade de que aves imunes sejam também por certo período excretoras do vírus **(3)**. Uma vez que há num mesmo lote pode haver aves em diferentes condições quanto a eliminação de vírus e presença de anticorpos, a combinação de testes sorológicos para anticorpos com testes para detecção de aves infectadas permite avaliar com mais precisão a condição do lote. Lotes com alta prevalência de aves com anticorpos indicam uma ampla disseminação lateral do vírus, sugerindo possíveis falhas na biosegurança e na eliminação de aves virêmicas e/ou excretoras do vírus.

Diagnóstico do ALV-J em matrizes de linhas de corte

Foi realizado isolamento e identificação do vírus de leucose J no laboratório de virologia da Embrapa Suínos e Aves utilizando a associação de ELISA, isolamento viral em cultivos de fibroblastos C/E, ELISA para anticorpos contra gp85 do ALV-J e PCR.

Linhas de matrizes de corte foram inicialmente testadas por ELISA para p27 para identificação de aves positivas, detectando-se portanto tanto aves positivas para vírus endógeno como exógeno. Para identificar especificamente aves infectadas pelo ALV exógeno foram coletadas amostras de soros das aves positivas por ELISA p27 para o isolamento viral em culturas de fibroblastos C/E. O teste de isolamento viral (Tabela 2) em amostras de soros permitiu identificar aves virêmicas nestes lotes de aves de linhagem de corte em fase final de produção. Do total de aves positivas para ALV, apenas uma percentagem muito inferior resultou em isolamento do vírus, e portanto de

tratar-se de aves com infecção por ALV exógeno. A presença do ALV-J foi confirmada através da detecção de anticorpos contra gp85 por teste de ELISA nestes lotes. A confirmação de que a viremia detectada por isolamento viral tratava-se da infecção pelo ALV-J foi também demonstrada por RT/PCR em amostras de soro (Tabela 2) em três diferentes linhas de matrizes de corte.

Tabela 1. Comparação entre níveis de ALV endógeno X exógeno e anticorpos (Ac) anti gp85 do ALV-J em 3 linhas de corte (L1, L2 e L3).

	ELISA p27 em albumina do ovo* (positivas/testadas)	Isolamento viral nas amostras pos para p27 (viremia)	% do lote positivo p/ ALV exógeno	% de aves com Anticorpos p/ gp85
L1	45+/234 (19%)	7+/45	3%	64%
L2	19+/267 (7,1%)	5 +/ 19	1,9 %	29%
L3	21+/122(17 %)	5 +/21	4 %	64%

- N° aves positivas/N° aves testadas (% positivas) ** N° soros positivos para ALV exógeno/N° de soros de aves positivas para p27.

Diagnóstico do ALV-J por PCR

Alguns resultados preliminares de PCR, comparando a detecção do vírus J por dois diferentes PCR utilizando diferentes pares primers para amplificação de seqüências do elemento E (Fadly e colaboradores) ou de uma seqüência de gp85 (Venugopal e colaboradores), resultaram 70% negativos na detecção do elemento E e 100% positivos com primers para gp85, sugerindo a probabilidade da ocorrência de variantes no país. O dois PCR foram também aplicados ao diagnóstico do ALV em amostras de fígado com lesão tumoral sugestiva de leucose mielóide, onde novamente o PCR com primers para o elemento E falharam em detectar duas de três amostras

positivas com primers para gp85. Estes resultados devem ainda ser re-avaliados através do sequenciamento de gp 85 e região do elemento E nestas amostras de vírus, para confirmar se são de fato variantes ou se os resultados obtidos refletem apenas diferente sensibilidade conferida pelos diferentes primers nos dois testes de PCR.

Correlação entre isolamento viral e RT/PCR para gp85 em amostras de soro

Tabela 2. Correlação entre isolamento viral e RT/PCR para ALV-J em amostragem de soros.

Linha de corte	Soro	Isolamento viral	RT/PCR
L5	1	negativo	negativo
L5	2	negativo	negativo
L4	3	positivo	positivo
L4	4	positivo	positivo
L4	5	negativo	negativo
L4	6	positivo	positivo
L1	7	positivo	positivo
L1	8	negativo	negativo
L1	9	positivo	positivo
L1	10	negativo	negativo
L1	11	positivo	positivo
L1	12	positivo	negativo
	DNA Controle*	Não testado	positivo

* DNA controle, ALV-J cepa HPRS103.

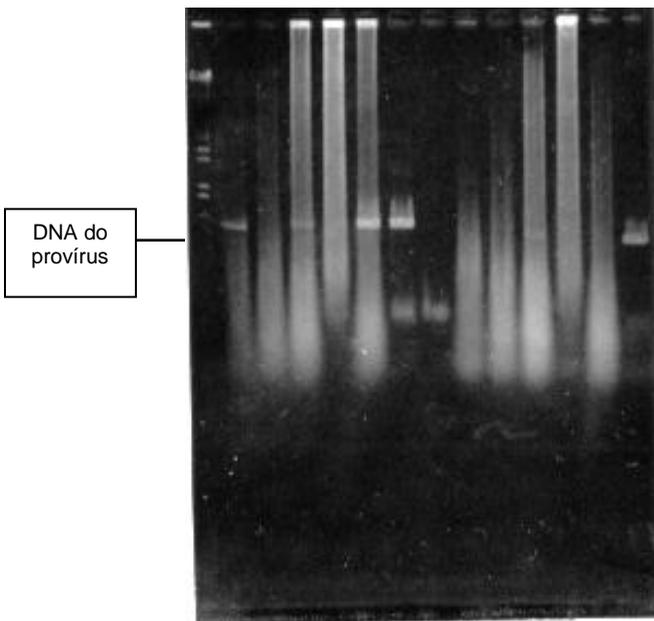
A amostragem é relativamente pequena para conclusão definitiva, mas estes resultados demonstrados na tabela 2, com a discordância em 1 soro, indicam que nas nossas condições laboratoriais o isolamento viral possa ser suficientemente sensível como o RT/PCR no diagnóstico de aves positivas para ALV, além de demonstrar a possibilidade de que falsos negativos podem ser mais observados no PCR que no isolamento viral.

A associação do isolamento viral, RT/PCR e ELISA-anticorpos-gp85 permitiram definir mais precisamente os reais

níveis de infecção pelo ALV nas linhas de corte avaliadas e o diagnóstico específico da infecção pelo vírus do subgrupo J.

RESULTADOS DO TESTE DE PCR (detecção de provírus) EM AMOSTRAS DE FÍGADO COM TUMORES SUGESTIVOS DE LEUCOSE– J.

PM 1 2 3 4 5 C+ C- 6 7 8 9 10+



Posição gel

Amc

PM	DNA-peso molecular
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5
C+	DNA controle ALV-J
C-	Controle negativo
6	1
7	2
8	3
9	4
10	5
C+	DNA controle ALV-J

positivo
 negativo
positivo
 negativo
positivo
 positivo
 negativo

Primers para gp85 do ALV-J

negativo
 negativo
positivo
 negativo
 negativo
 positivo

Primers para LTR e elemento E do ALV-J

Referências

- (1) BAL, J., PAYNE, L.N. E SKINNER, M.A. HPRS103 (exogenous avian leukosis virus, subgroup J) has an env gene related to those of endogenous elements EAV-0 and E51 and an E element found previously only in sarcoma viruses. *J. Virol.* 69(2):779-784. 1995.
- (2) PAYNE, L. N.; BROWN, S.R.; BUMSTEAD, N.; HOWES, K.; FRAZIER, J. e THOULESS, M.E. A novel subgroup of avian leukosis virus in chickens. *J. Gen. Virol.* 72: 801-807, 1991.
- (3) PAYNE, L.N. Retrovirus-induced disease in poultry. *Poul. Sci.* 77: 1204-1212. 1998.
- (4) SMITH, L.M.; BROWN, S.R.; HOWES, K.; McLEOD, S.; ARSHAD, S.S.; BARRON, G.S.; VENUGOPAL, K.; McKAY, J. C. e PAYNE, L.N. Development and application of polymerase chain reaction for the detection of subgroup j avian leukosis virus. *Virus Res.* 54: 87-98, 1998.
- (5) SMITH, E.J., WILLIAMS, S.M. e FADLY, A.M. Detection of avian leukosis virus subgroup J by polymerase chain reaction. *Avian Dis.* 42: 375-380. 1998.
- (6) VENUGOPAL, K.; HOWES, K., BARRON, G.S.; PAYNE, L.N. Recombinant env-gp85 of HPRS103 (subgroup J) avian leukosis virus: Antigenic usefulness as a diagnostic reagent. *Avian Dis.* 41: 283-288, 1997.
- (7) VENUGOPAL, K., SMITH, L.M., HOWES, K. e PAYNE, L.N. Antigenic variants of J subgroup avian leukosis virus: sequence analysis reveals multiple changes in the env gene. *J. Gen. Virol.* 79: 757-766. 1998.
- (8) IGNJATOVIC, I. Congenital transmission of avian leukosis virus in the absence of detectable shedding of group specific antigen. *Australian Vet. J.* 67(8): 299-301. 1990.

PATHOGENESIS OF CHICKEN INFECTIOUS ANEMIA VIRUS

Karel A. Schat, Carol J. Cardona and Carrie Markowski

Unit of Avian Health,
Department of Microbiology and Immunology,
Cornell University, Ithaca NY 14853

Chicken infectious anemia virus (CIAV), also known as chicken anemia virus or CAV, belongs to the family of Circoviridae. It was recognized for the first time as a pathogen for chickens in 1978 in Japan. However, the virus is not a new pathogen because it has been isolated from ampules with Marek's disease tumor cells that have been stored in liquid nitrogen since 1969. Soon afterwards it became clear that CIAV has a world-wide distribution (Von Bülow and Schat, 1997). CIAV is extremely resistant to disinfectants and heat treatment, especially when the virus is present in organic material. As a consequence it is almost impossible to eliminate CIAV from commercial poultry farms.

Infection with CIAV can cause lesions but mostly in young chicks free of maternal antibodies. These lesions include anemia, severe thymus atrophy, bone marrow aplasia, and secondary infections (e.g., blue wing disease) as a consequence of immunosuppression. Mortality can vary, but is generally low. Chicks can recover from infection once they become immunocompetent and start to produce antibodies. In older birds infection does not cause lesions, but more subtle changes affecting immune responses have been reported. The production of cytokines involved in the generation of cytotoxic T lymphocytes (CTL) [e.g., IL-2, IL-1, and interferon (IFN)- γ] are particularly affected (Adair et al, 1991, McConnell et al 1993 a and b). We have evidence that CIAV infection in birds in which maternal antibodies have disappeared, can affect cell-mediated immune responses. In CIAV-free chickens, CTL specific for reticuloendotheliosis virus (REV) and Marek's disease virus (MDV) have consistently been detected between 6 to 8 days post infection (Weinstock et al. 1989, Pratt et al. 1992, Omar and

Schat, 1996, Omar et al, 1998). However, the generation of antigen-specific CTL against REV and, more importantly, MDV was impaired in CIAV-infected chickens. The generation of natural killer cells in response to MD vaccination does not seem to be affected by infection with CIAV (Markowski et al, in preparation) confirming earlier studies that vaccination with SB1 or HVT activates NK cells (Heller and Schat, 1987)

Chickens can become infected by vertical and horizontal routes of exposure. The latter occurs probably through the fecal-oral route because CIAV can be found in fecal material during active infection. Vertical transmission through semen and probably also through the female reproductive tract has been reported when adult birds become infected in the absence of antibodies. As soon as virus- neutralizing (VN) antibodies develop the virus can no longer be isolated from infected chickens nor from their embryos suggesting that the virus has been cleared and is not longer transmitted horizontally or vertically. However, data from our laboratory suggests that this is not the case (Cardona et al, a and b, submitted for publication). Our specific pathogen-free flocks became infected during 1997. Seroconversion occurred in 100% of the N2a flock and 70% of the P2a flock; in contrast only 27% of the S13 flock developed antibodies after the infection occurred. These three flocks were maintained in the same building without barriers between the strains. In the second generation flocks, which were exposed by contact to the first generation of positive flocks, seroconversion occurred at the same level as in the first generation flocks. We were able to monitor the development of the antibodies in the second generation of the S13 and P2a flocks. Both flocks started to develop antibodies after 20 weeks of age suggesting a link with the development of sexual maturity. We planned to develop flocks free of CIAV in a second building which following the literature requires the presence of maternal antibodies in hatching eggs at least 6 to 8 weeks prior to collection. In an attempt to induce a homogenous level of antibodies in the three strains all chicks of the third generation flocks were vaccinated

with a commercial vaccine against CIAV. Most of the birds including chickens of the S13 line developed antibodies between 7 and 14 weeks after infection, but only 75% of the S13 flock seroconverted.

The birds of the first two generations of infected flocks were used to determine if CIAV could be detected 4 to 5 months post seroconversion. Surprisingly, CIAV could be detected by nested PCR in a high percentage of the gonadal tissues obtained from male and female chickens. These results suggest that CIAV could remain present in the gonadal tissues and be passed on to the embryo independent of the presence of antibodies. Preliminary data suggest that this is indeed possible. This could also explain the intermittent problems with CIAV that have been reported in specific-pathogen-free flocks.

In conclusion, these results indicate that the pathogenesis of CIAV infection is far more complex than has been reported previously. The consequences are that infection after maternal antibodies have disappeared can cause specific immunosuppression of T cell immunity by interfering with the development of specific CTL responses which are important in many viral infections and are of crucial importance for the protection against Marek's disease. A second consequence is that intermittent transmission of CIAV in SPF eggs can have consequences for vaccine production.

References

- ADAIR, B.M., F. MCNEILLY, C.D.G. MCCONNELL, D. TODD, R.T. NELSON, and M.S. MCNULTY. 1991. Effects of chicken anemia agent on lymphokine production and lymphocyte transformation in experimentally infected chickens. *Avian Dis* 35:783-792.
- BÜLOW V. VON, and K.A. SCHAT. Chicken infectious anemia virus. In: B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald, Y.M. Saif (eds) *Diseases of Poultry*, 10th

edition, pp:739-756. Iowa State Press, Ames, Iowa, 1997. Heller, E.D. and K.A. Schat. Enhancement of natural killer cell activity by Marek's disease vaccines. *Avian Pathol.* 16:51-60. 1987.

OMAR, A.R., and K.A. SCHAT. Syngeneic Marek's disease virus (MDV)-specific cell-mediated immune responses against immediate early, late, and unique MDV proteins. *Virology* 222: 87-99. 1996.

OMAR, A.R., K.A. SCHAT, L.F. LEE, and H.D. HUNT. Cytotoxic T lymphocyte response in chickens immunized with a recombinant fowlpox virus expressing Marek's disease herpesvirus glycoprotein B. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 62:73-82. 1998.

MCCONNELL, C.D.G., B.M. ADAIR, and M.S. MCNULTY. 1993a. Effects of chicken anemia virus on macrophage function in chickens. *Avian Dis* 37:358-365.

MCCONNELL, C.D.G., B.M. ADAIR, and M.S. MCNULTY. 1993b. Effects of chicken anemia virus on cell-mediated immune function in chickens exposed to the virus by a natural route. *Avian Dis.* 37:366-374.

PRATT, W.D., R. MORGAN, and K.A. SCHAT. Cell-mediated cytolysis of lymphoblastoid cells expressing Marek's disease virus-specific phosphoproteins. *Vet. Microbiol.* 33: 93-99. 1992. Weinstock, D., Schat, K.A., and B.W. Calnek. Cytotoxic T lymphocytes in reticuloendotheliosis virus-infected chickens. *Eur. J. Immunol.* 19:267-272. 1989.