

PATOGENICIDADE DE UMA CEPA DO VÍRUS HERPES DA DOENÇA DE MAREK

LUIZ FELIPE DE CASTRO GRAEFF VIANNA² E CARLOS H. ROMERO³

ABSTRACT.- Vianna L.F.C.G. & Romero C.H. 1982. [Pathogenicity of a strain of Marek's disease herpes virus.] Patogenicidade de uma cepa do vírus herpes da doença de Marek. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 3(4):131-139. Embrapa-Patologia Animal, Km 47, Seropédica, RJ 23460, Brazil.

The objective of the present work was to study the pathogenicity of a Brazilian strain of Marek's disease herpes virus (MDV). Chicks experimentally infected at one day of age developed antibody which was detected by the agar gel precipitation test four weeks later. Contact-exposed chickens developed antibody after eight weeks. Antibody persisted through the 12th week, when the last assay was performed. Uninoculated control chickens reared in isolation remained free of antibody during the same period. Viral antigens were detected in impression smears of spleen, thymus and bursa of Fabricius of inoculated chickens and in those of spleen and bursa of Fabricius of contact-exposed chickens by using a direct immunofluorescent technique. No fluorescence was observed in impression smears of brain, liver, gonads or kidney of all chickens tested. Impression smears of all tissues from uninoculated control chickens were negative. Precipitating antibody against the herpes virus of turkeys was demonstrated in the blood, and tissue extracts of kidney, feather tips, spleen, thymus, bursa of Fabricius and gonads of inoculated and contact-exposed chickens. No antibody was found in similar tissue extracts from uninoculated control chickens. Lymphoid infiltration corresponding to types A, B and C and their combination were observed in the vagus nerves and in the nerves of the brachial and sciatic plexus of chickens experimentally inoculated with MDV. Lymphoid infiltrations in the skin, kidney and gonads, as well as lymphoid depopulation with cystic degeneration of the thymus and bursa of Fabricius, were observed in the inoculated chickens. Similar lesions were observed in the kidney, skin, and nerves of contact-exposed chickens. No microscopic lesions were present in the uninoculated control chickens. It is concluded that the strain of MDV studied induces clinical symptoms, macroscopic and microscopic lesions characteristic of the neural form of Marek's disease, stimulates the development of antibody in the serum, spreads horizontally, and gives rise to viral antigens and antibody detectable in tissue extracts.

INDEX TERMS: Virus, Marek's disease, pathogenicity.

SINOPSE.- O objetivo do presente trabalho foi estudar a patogenicidade de uma cepa brasileira do vírus herpes da doença de Marek (VDM). Aves experimentalmente infectadas com um dia de idade, desenvolveram anticorpos os quais foram detectados pelo teste de precipitação em gel de ágar, após quatro semanas. Aves expostas por contato desenvolveram anticorpos após oito semanas. Tais anticorpos persistiram até a 12ª semana, quando o experimento foi encerrado. Aves testemunhas (não inoculadas) mantidas em isolamento, permaneceram livres de anticorpos durante o mesmo período. Antígenos virais foram detecta-

dos em impressões de baço, timo e bursa de Fabricius de aves inoculadas e em impressões de baço e bursa de Fabricius de aves expostas por contato, através da prova de imunofluorescência direta. Fluorescência não foi observada em impressões de cérebro, fígado, gônadas e rins de todas as aves testadas. Todas as impressões de tecidos de aves testemunhas foram negativas. Anticorpos precipitantes contra o vírus herpes de perus (HVT) foram demonstrados no sangue e nos extratos de tecidos renal, pontas de penas, baço, timo, bursa de Fabricius e gônadas de aves inoculadas ou expostas por contato. Anticorpos não foram encontrados nos extratos dos mesmos tecidos, de aves testemunhas. Infiltrações linfocitárias correspondentes aos tipos A, B e C e suas combinações, foram observadas nos nervos vagos e nos plexos braquial e ciático de aves inoculadas experimentalmente com o VDM. Infiltrações linfocitárias na pele, rins e gônadas, assim como, despovoamento linfóide com degeneração cística do timo e da bursa de

¹ Aceito para publicação em 15 de junho de 1983.

² Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23460.

³ Unidade de Pesquisa de Patologia Animal, EMBRAPA, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23460.

Fabricius, foram encontradas nas aves inoculadas. Lesões semelhantes foram também observadas nos rins, pele e nervos das aves expostas por contato. Lesões microscópicas não foram visualizadas nas aves testemunhas. Conclui-se que a cepa do VDM estudada, induz sintomas clínicos, lesões macro e microscópicas características da forma neural da doença de Marek, estimula o desenvolvimento de anticorpos no soro, dissemina-se horizontalmente e dá origem a antígenos virais e anticorpos detectáveis nos extratos de tecidos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Vírus, doença de Marek, patogenicidade.

INTRODUÇÃO

A doença de Marek (DM) é uma neoplasia de natureza linfoproliferativa, descrita pela primeira vez pelo cientista húngaro Marek (1907), causada por um vírus herpes associado a célula (Churchill & Bigs 1967, Nazerian et al. 1968, Solomon et al. 1968). O hospedeiro natural é *Gallus domesticus*, mas o vírus também tem sido isolado de codornas, faisões e perus (Calnek & Witter 1978). O vírus da doença de Marek (VDM) replica-se no epitélio folicular das penas, onde são formadas partículas virais infecciosas com envelope. Este epitélio folicular parece ser o único local da ave onde o vírus é replicado constantemente até atingir a maturidade (Calnek et al. 1970). A descação constante das células epiteliais contendo o VDM infeccioso é responsável pela contaminação dos galpões e pela propagação da doença (Calnek et al. 1970).

As cepas do VDM variam na sua antigenicidade (von Bülow & Biggs 1975), virulência e tropismo tissular (Purchase & Biggs 1967) e na eficiência da imunidade homóloga ou heteróloga por elas produzidas (Witter et al. 1980, Witter 1982). As interações destas propriedades do VDM com o hospedeiro, são responsáveis pelas variações em suas formas clínicas neural, visceral, cutânea e ocular observadas em condições de campo. Porém, cepas padronizadas do VDM isoladas nos E.U.A., tais como a cepa GA (Eidson & Schmittle 1968) e a cepa JM (Sevoian et al. 1962) produzem quase exclusivamente lesões viscerais e neurais, respectivamente.

A DM constitui a única neoplasia para a qual existe uma vacina, a qual é utilizada extensivamente em todo mundo. Esta vacina é elaborada a partir da cepa FC-126 do vírus herpes de perus (HVT), isolado durante estudos sobre a prevalência do VDM nesta espécie (Witter et al. 1970).

Apesar do HVT ser utilizado no Brasil na prevenção da DM, através da vacinação maciça de pintos de um dia de idade, não existem relatórios sobre o isolamento e caracterização de cepas do VDM que ocorrem naturalmente em nossos plantéis avícolas. A disponibilidade de cepas autóctones, permitiria avaliar a capacidade imunogênica das vacinas usadas em nosso meio, bem como, estudar a doença em suas diferentes formas e iniciar pesquisas referentes aos mecanismos de imunidade que operam na proteção das aves vacinadas.

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar uma cepa do VDM, isolada de uma ave não vacinada, com paralisia das pernas, com anticorpos específicos no soro e com lesões macro e microscópicas características da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Aves

Todas as aves foram Leghorn brancas da linhagem 7 sub-linha 2 (Stone 1975) originalmente obtidas do Regional Poultry Research Laboratory, East Lansing, MI., E.U.A., as quais são altamente susceptíveis a forma neural e visceral da doença de Marek (Witter & Burmester 1979). As matrizes da progênie utilizada no presente trabalho, tinham sido criadas sob condições de semi-isolamento e eram livres de anticorpos precipitantes no soro tanto contra o VDM como o HVT.

Vírus da doença de Marek

O VDM utilizado foi a segunda passagem de sangue heparinizado, infectado, mantido em 10% de dimetilsulfóxido em nitrogênio líquido. O vírus tinha sido isolado do sangue de um galo de briga, não vacinado, com sintomas clínicos e lesões macro e microscópicas características da forma neural da DM, por passagem sucessiva em pintos da linhagem 7₂ de um dia de idade. O sangue foi descongelado rapidamente em água a 37°C, diluído 1:5 em uma mistura dos meios de cultura F10 e 199 suplementados com 4% de soro de bezerro e utilizado como inoculam na infecção experimental das aves.

Antisoros de referência

Aves da linhagem 7₂ de um dia de idade, foram inoculadas intra-abdominalmente com 0,1 ml da segunda passagem do sangue contendo o VDM. Todas as aves que não desenvolveram a doença clílica foram novamente inoculadas aos 2, 3 e 7 meses de idade com 0,5, 1,0 e 1,0 ml do sangue infectado, respectivamente. Estas aves foram sangradas duas semanas após cada uma das três últimas inoculações e os soros que reagiram com uma linha de precipitação nítida com os antígenos-referência, foram selecionados para sua utilização como soros-referência. Durante a preparação dos antisoros, estas aves foram mantidas em isolamento.

Antisoro conjugado para imunofluorescência

Foi preparado um pool com porções dos soros-referência e as imunoglobulinas foram precipitadas com concentrações decrescentes de sulfato de sódio, conjugadas com fluoresceína de isotiocianato (FITC) e passadas através de uma coluna de cromatografia contendo Sephadex G-25 (Purchase 1973). O antisoro conjugado tinha um título de 1:32 quando testado contra os antígenos-referência na prova de imunodifusão.

Antígenos de referência

A cepa FC-126 do HVT (Witter et al. 1970), foi propagada em culturas de fibroblastos de embrião de galinha livres do vírus da leucose aviária, preparados segundo a técnica descrita por Solomon (1975). O efeito citopático induzido pelo HVT foi confluyente entre os cinco e sete dias após a inoculação e as monocamadas eram desprendidas por agitação no próprio meio de cultura. As células foram imediatamente centrifugadas a 1500 rpm durante 12 minutos a 8-10°C. Os antígenos-referência foram preparados tanto dos sobrenadantes como dos sedimentos celulares. Os sobrenadantes foram colocados em tubos de diálise e concentrados 80 vezes em polietilenoglicol 6000 e finalmente, ressuspensos em água destilada. Os sedimentos celulares foram ressuspensos em tampão fosfatado salino e padronizados para conter 50 x 10⁶ células por ml. Estas suspensões celulares foram congeladas e descongeladas quatro vezes e utilizadas com ou sem prévia centrifugação, como antígenos de referência celular. Tanto os antígenos preparados dos sobrenadantes como dos sedimentos celulares, reagiram quando confrontados com os soros-referência, com uma linha de precipitação idêntica, na prova de imunodifusão. Os antígenos extraídos de sobrenadantes e de monocamadas de fibroblastos de embrião de galinha não infectados com HVT não reagiram com os soros-referência.

Prova de imunodifusão

Ágar Difco purificado (Difco Laboratories E.U.A.) a 1% em tampão fosfatado salino (NaCl 8,5 g, KCl 0,02 g, Na₂HPO₄ 0,12 g, KH₂PO₄

PATOGENICIDADE DO VÍRUS HERPES DA DOENÇA DE MAREK

0,02 g e EDTA di-sódico 0,04 g em 100 ml de água destilada) pH 7,3 foi distribuído uniformemente em lâminas de vidro 75 x 25 mm previamente limpas. Os orifícios no ágar, um central e seis periféricos tinham 3,5 mm de diâmetro e estavam 3,5 mm equidistantes um do outro. O antisoro-referência foi colocado no orifício central e o antígeno-referência nos orifícios periféricos superior e inferior. Os quatro orifícios laterais foram preenchidos com os soros ou com os extratos dos tecidos a serem testados para evidenciar a presença de anticorpos ou antígenos. As lâminas eram incubadas em câmara úmida a temperatura ambiente e a leitura da prova realizada após 24, 48 e 72 horas de incubação. A prova foi considerada válida quando o soro-referência reagia com os antígenos-referência formando uma linha nítida de precipitação. As amostras em teste que apresentavam uma linha de identidade com a linha referência foram consideradas positivas.

Prova de imunofluorescência

Foi desenvolvida uma prova de imunofluorescência direta para detectar antígenos do VDM em esfregaços de sangue e impressões de tecidos. Os esfregaços de sangue e as impressões de baço, bursa de Fabricius, cérebro, fígado, gônadas, pele, rins e timo foram feitos em lâminas de vidro finas, fixadas imediatamente em acetona refrigerada durante quatro minutos e mantidas a 8°C até o momento da prova. As áreas a serem examinadas, duas por lâmina, foram demarcadas com esmalte, lavadas em tampão para imunofluorescência (Becton, Dickinson & Co., E.U.A.) e cobertas com duas gotas de antisoro específico para o VDM, conjugado com FITC e diluído 1:16. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C durante uma hora, lavadas três vezes em tampão para imunofluorescência e examinadas com microscópio de fluorescência.

Processamento de tecidos para imunodifusão

Durante a necropsia, fragmentos de baço, bursa de Fabricius, cérebro, fígado, gônadas, pontas das penas, rins e timo de duas a três aves do mesmo lote, foram colocados em frascos de vidro contendo 2 ml de uma mistura dos meios de culturas F10 e 199 suplementados com 20% de soro de bezerro e congelados a -70°C até o seu processamento. Os fragmentos foram macerados no mesmo meio de cultura em triturador TenBroeck, congelados e descongelados quatro vezes e centrifugados a temperatura ambiente a 2000 rpm durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram imediatamente testados para a presença de antígenos ou anticorpos na prova de imunodifusão.

Histopatologia

As aves foram sacrificadas por exanguinação ou por injeção de ar no coração sendo imediatamente necropsiadas para determinar a presença de lesões macroscópicas compatíveis com a forma neural da DM. Fragmentos de baço, bursa de Fabricius, cérebro, fígado, gônadas, nervos dos plexos braquial e ciático e nervos vagos, rins e timo foram fixados

em formalina a 10% e processados para preparar cortes para exame histopatológico por técnicas rotineiras. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e examinados em microscópio simples para verificar a presença de lesões características da DM.

Desenho experimental

Setenta e cinco pintos de um dia de idade foram distribuídos aleatoriamente em três lotes de 25 e identificados individualmente com ael na membrana da asa. As aves do lote 1 foram inoculadas intra-abdominalmente com 0,2 ml da preparação contendo o VDM. As aves do lote 2 não foram inoculadas, mas misturadas com as do lote 1 e criadas juntas no chão, em condições de semi-isolamento. As aves do lote 3 foram criadas em uma área isolada em gaiolas de metal. Três aves de um dia de idade, da mesma eclosão, foram exanguinadas para obtenção de soro. Nas semanas 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 e 12, duas ou três aves foram retiradas de cada lote. Sangue foi obtido de cada uma tanto em heparina como sem anticoagulante para obtenção de soro. Depois de serem sacrificadas, as aves foram necropsiadas e rotineiramente examinadas macroscopicamente, os nervos vagos e os nervos dos plexos braquial e ciático assim como as gônadas. Fragmentos de baço, rins, bursa de Fabricius, cérebro, fígado, gônadas, timo e pontas de penas retiradas das asas, foram obtidos para preparar impressões para imunofluorescência, cortes histopatológicos e para determinar a presença de anticorpos ou antígenos pela prova de imunodifusão. Todos os soros obtidos foram testados na prova de imunodifusão para detectar anticorpos contra o HVT.

RESULTADOS

Desenvolvimento de anticorpos

Não foram detectados anticorpos de origem materna contra o VDM nos soros das aves sacrificadas no dia da eclosão, quando testados pela prova de imunodifusão. Porém, o "pool" dos soros obtidos das aves de uma semana de idade, inoculadas e em contato, continham anticorpos passivos, os quais não foram mais detectados uma semana depois. Anticorpos ativos foram detectados pela primeira vez, em uma de três aves, quatro semanas após a inoculação. Daí em diante, anticorpos foram consistentemente encontrados nos soros das aves inoculadas, até a 12ª semana, quando o experimento foi encerrado (Quadro 1, Fig. 1). No caso das aves em contato com as aves inoculadas, anticorpos no soro foram inicialmente demonstrados quando as aves tinham oito semanas de idade, sendo a partir daí, encontrados frequentemente até a 12ª semana. Todas as aves testemunhas sem contato com aves infectadas,

Quadro 1. *Desenvolvimento de anticorpos^(a) no soro em aves infectadas experimentalmente com o vírus da doença de Marek^(b)*

Tipo de infecção	Idade das aves em semanas									Total
	0	1	2	3	4	6	8	10	12	
Inoculação	-	pool + ^(c)	0/3	0/3	1/3	3/3	3/3	2/3	4/4	13/25 (52,0) ^(d)
Contato	-	pool ++	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	3/3	2/2	7/23 (30,4)
Nenhuma	0/3	pool -	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/8	0/26 (0,0)

(a) Testados na prova de imunodifusão em lâmina.

(b) Aves inoculadas por via intra-abdominal com o vírus da doença de Marek (Inoculação), em coabitação com as aves inoculadas (Contato) e não inoculadas (Nehuma).

(c) Pool do soro de três pintos fortemente positivo (++) , fraco positivo (+) e negativo (-).

(d) Número de aves com anticorpos no soro/número de aves testadas (percentagem com anticorpos).

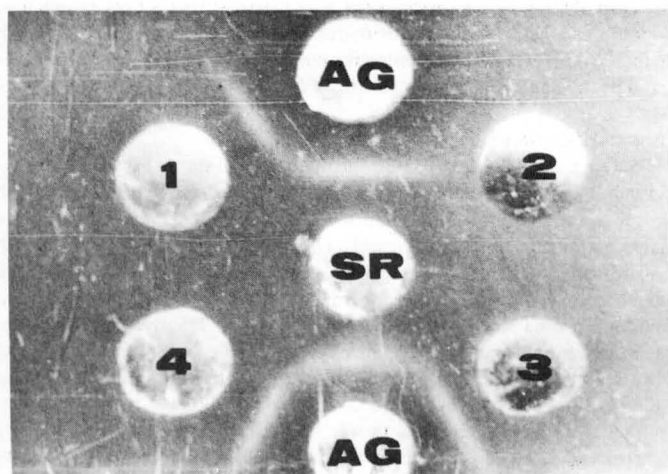


Fig. 1. Prova de imunodifusão em gel de ágar em lâmina para detectar anticorpos contra o vírus da doença de Marek. Ag-Antígeno-referência, Sr=Soro-referência, Orifícios 1, 3 e 4 = Soros com anticorpos contra o VDM, Orifício 2 = Soro livre de anticorpos contra o VDM.

permaneceram livres de anticorpos durante as 12 semanas de experimento. Todavia, todos os soros obtidos foram testados para verificar a presença de anticorpos contra o vírus da doença bursal infecciosa, pela prova de imunodifusão (Weissman & Hitchner 1978), sendo todos resultados negativos (resultados não apresentados).

Distribuição de antígenos virais em órgãos e tecidos

Antígenos do VDM foram detectados no baço e no timo das aves anoculadas de uma semana de idade, utilizando-se a prova direta de imunofluorescência. A fluorescência observada foi caracterizada pela presença de grânulos arredondados e ovais, presentes no citoplasma de células mononucleares e em alguns casos fora delas. Este antígeno viral foi detectado no baço até a sexta semana após a inoculação (Quadro 2). No baço das aves em contato, o antígeno foi inicialmente demonstrado às três semanas de idade e persistiu até a oitava semana, enquanto que jamais foi observado no baço das aves testemunhas. Antígeno viral foi também detectado na bursa de Fabricius das aves inoculadas a partir da segunda semana até a 12ª

Quadro 2. Distribuição de antígenos do vírus da doença de Marek em órgãos e tecidos de aves detectados através da prova direta de imunofluorescência

Idade em semanas	Tipo de infecção ^(a)	Órgãos e tecidos								
		Baço	Bursa	Cérebro	Fígado	Gônada	Pele	Rim	Sangue ^(b)	Timo
1	I	+	-	-	-	-	+	-	-	+
	C	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	T	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2	I	+	+	-	-	-	+	-	2/3	-
	C	-	-	-	-	-	+	-	3/3	-
	T	-	-	-	-	-	+	-	1/2	-
3	I	+	+	-	-	-	+	-	1/3	-
	C	+	-	-	-	-	+	-	1/3	-
	T	-	-	-	-	-	+	-	0/2	-
4	I	+	+	-	-	-	+	-	2/3	-
	C	+	+	-	-	-	+	-	1/3	-
	T	-	-	-	-	-	+	-	0/2	-
6	I	+	-	-	-	-	+	-	1/3	-
	C	+	-	-	-	-	+	-	1/3	-
	T	-	-	-	-	-	+	-	0/2	-
8	I	-	+	-	-	-	+	-	1/3	-
	C	+	-	-	-	-	+	-	2/3	-
	T	-	-	-	-	-	+	-	0/2	-
10	I	-	-	-	-	-	+	-	2/3	-
	C	-	-	-	-	-	+	-	1/3	-
	T	-	-	-	-	-	+	-	0/2	-
12	I	-	+	-	-	-	+	-	0/3	-
	C	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	T	-	-	-	-	-	+	-	1/2	-

(a) Aves infectadas (I) com 1 dia de idade por inoculação intra-abdominal com o vírus da doença de Marek, em contato (C) com as aves infectadas e criadas em isolamento como testemunhas (T) não-infectadas.

(b) Número com fluorescência/número de aves testadas.

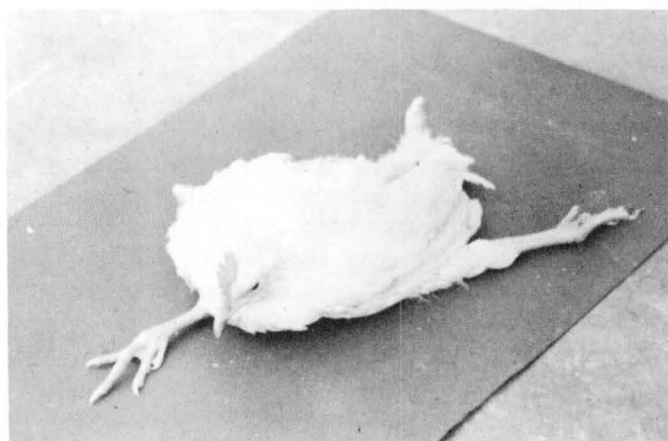


Fig. 2. Ave de 10 semanas de idade apresentando sintomas característicos da forma neural da doença de Marek.

semana e no mesmo órgão, das aves em contato com quatro semanas de idade. Resultados negativos para antígenos virais foram sempre obtidos nas impressões de cérebro, fígado, gônadas e rins de todas as aves testadas. As impressões de pele e os esfregaços de sangue, exibiam fluorescência não específica, independente da infecção com o VDM.

Distribuição de anticorpos em órgãos e tecidos

Anticorpos contra o HVT foram encontrados consistentemente nos rins e no sangue das aves inoculadas a partir da sexta semana e nas aves em contato, a partir da oitava semana no sangue e nos rins. Estes anticorpos foram também detectados no baço, bursa de Fabricius e gônadas das aves infectadas a partir da 10ª semana enquanto que, no timo e nas pontas das penas, foram demonstrados esporadicamente (Quadro 3). Anticorpos jamais foram encontrados nos tecidos das aves testemunhas. Interessantemente, antígeno específico do VDM foi de-

Quadro 3. Distribuição de anticorpos contra o vírus Herpes de perus em órgãos e tecidos de aves experimentalmente infectadas com uma cepa neural do vírus da doença de Marek

Idade em semanas	Tipo de infecção ^(a)	Órgão e tecidos								
		Baço	Bursa	Cérebro	Fígado	Gônadas	Ponta das penas	Rim	Sangue	Timo
1	I	-	-	-	-	NR	-	*	- (pool de 3)	-
	C	-	-	-	-	NR	-	*	+ (pool de 3)	-
	T	-	-	-	-	NR	-	*	- (pool de 3)	-
2	I	-	-	-	*(b)	NR	*	-	- (0/3)	-
	C	-	-	-	*	NR	-	-	- (0/3)	-
	T	-	-	-	*	NR	-	*	- (0/2)	-
3	I	-	-	-	-	NR	*	*	- (0/3)	-
	C	-	-	-	-	NR	-	*	- (0/3)	-
	T	-	-	-	*	NR	-	*	- (0/2)	-
4	I	-	-	-	-	NR	*	*	- (0/1)	-
	C	-	-	-	-	-	-	*	- (0/3)	-
	T	-	-	-	-	-	-	*	NR	-
6	I	-	-	-	-	-	***(d)	+	+ (3/3)	-
	C	-	-	-	-	-	*	-	- (0/3)	-
	T	-	-	-	-	-	-	-	- (0/2)	-
8	I	-	-	-	-	-	** (c)	+	+ (3/3)	-
	C	-	-	-	-	-	-	+	+ (3/3)	-
	T	-	-	-	-	-	-	-	- (0/2)	-
10	I	+	+	-	-	+	**	+	+ (2/3)	+
	C	-	-	-	-	-	+	+	+ (3/3)	-
	T	-	-	-	-	-	-	-	- (0/2)	-
12	I	+	+	-	-	+	*	+	+ (3/3)	-
	C	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	T	-	-	-	-	-	-	-	- (0/2)	-

(a) Aves infectadas (I) com 1 dia de idade por inoculação intra-abdominal com o vírus da doença de Marek, em contato (C) com as aves infectadas e criadas em isolamento como testemunhas (T) não infectadas.

(b) Reagiu contra o soro-padrão.

(c) Reagiu contra o soro-padrão e rim com anticorpos.

(d) Reagiu contra o soro-padrão, rim, baço e bursa com anticorpos.

monstrado a partir da 2ª semana nos extratos preparados das pontas das penas de aves inoculadas e nas aves em contato com seis semanas de idade. Uma antigenicidade de natureza desconhecida foi encontrada nos rins e no fígado das aves até a quarta semana de idade, independentemente da infecção com o VDM.

Lesões macroscópicas

Durante o transcurso do experimento, quatro aves desenvolveram sintomas clínicos característicos da forma neural da DM evidenciados pela paralisia das pernas (Fig. 2). Duas aves de 5 e 10 semanas de idade tinham sido inoculadas enquanto que, outras duas aves de 10 e 11 semanas de idade haviam estado em contato com as aves inoculadas. Espessamento e co-

loração amarelada dos nervos vagos e dos plexos braquial e ciático foram observados durante a necropsia das últimas três aves.

Lesões microscópicas

Lesões microscópicas características da DM foram observadas principalmente nos nervos vagos, plexos braquial e ciático, pele e rins das aves inoculadas. As lesões foram inicialmente encontradas duas semanas após a inoculação, na pele e nos rins, as quais se caracterizavam por uma infiltração de linfócitos, plasmócitos e linfoblastos, algumas vezes dando lugar ao aparecimento de focos linfoproliferativos (Fig. 3). Infiltrações linfocitárias foram observadas nos nervos das aves inoculadas a partir da quarta semana. Estas lesões eram classificadas como

Quadro 4. Distribuição de lesões microscópicas nos diversos tecidos de aves infectadas experimentalmente com o vírus da doença de Marek

Idade em semanas	Tipo de infecção ^(a)	Órgãos e tecidos								Nervos		
		Baço	Bursa	Cérebro	Fígado	Gônada	Pele	Rim	Timo	Braquial	Ciático	Vago
1	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	I	-	-	-	-	-	+++ ^(e)	++++ ^(f)	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	I	-	-	-	-	-	+++	++++	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	I	-	-	-	-	-	+++	++++	-	-	B	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	I	-	-	-	FL	-	+++	++++	-	-	-	AC
	C	-	-	-	-	-	-	++++	-	-	-	-
	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	I	-	-	-	-	-	-	++++	-	-	AB	A
	C	-	-	-	FL	-	+++	-	-	-	-	-
	T	-	-	-	FL	-	-	-	-	-	-	-
10	I	-	+ ^(b)	FL ^(c)	FL	++ ^(d)	-	-	+++++ ^(g)	-	B	-
	C	-	-	FL	-	-	-	-	-	-	B	B
	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	I	-	+	-	FL	-	-	-	-	-	B ^(h)	B
	C	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	T	-	-	-	FL	-	-	-	-	-	-	-

(a) Aves inoculadas com 1 dia de idade por via intra-abdominal com o vírus da doença de Marek (I), em coabitação com as aves inoculadas (C) e testemunhas (T) não inoculadas.

(b) Despovoamento linfóide e degeneração cística dos folículos bursais e infiltração linfocítica interfolicular.

(c) Focos de proliferação linfóide.

(d) Abundante infiltração de plasmócitos e alguns linfócitos, linfoblastos e células de Marek.

(e) Proliferação de linfoblastos, linfócitos e plasmócitos no folículo da pena.

(f) Infiltração intertubular de linfócitos, plasmócitos, células de Marek e/ou presença de focos linfoproliferativos.

(g) Despovoamento e degeneração cística dos folículos.

(h) Lesões linfoproliferativas de tipo A, B, C ou mistas.

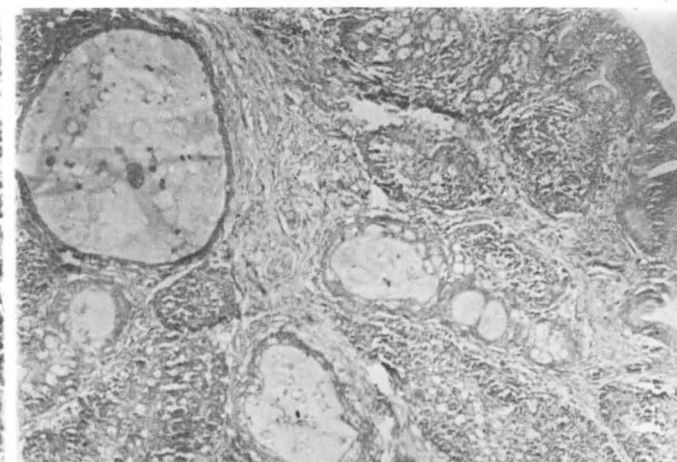
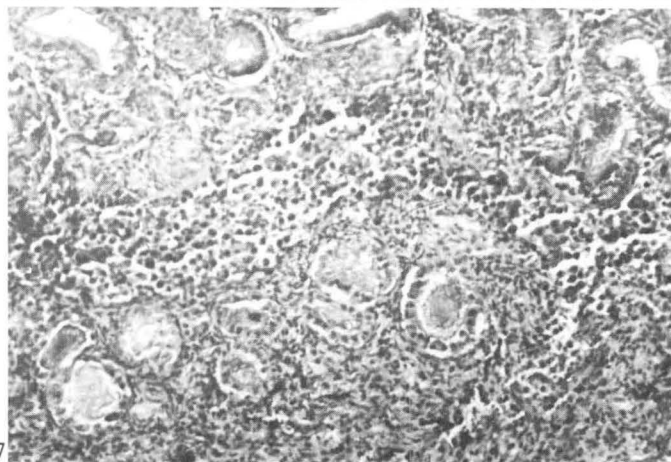
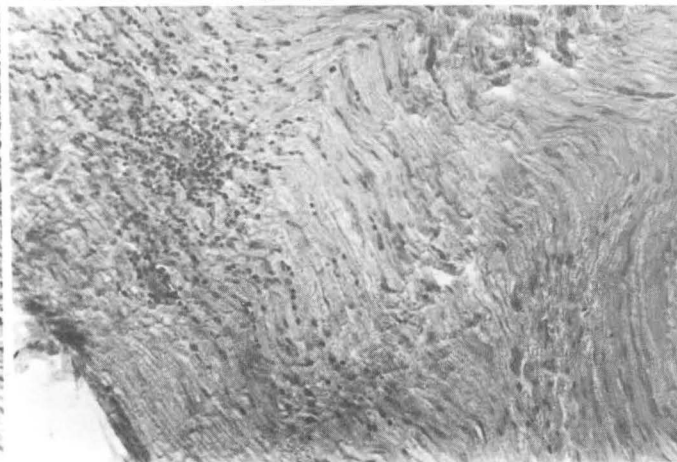
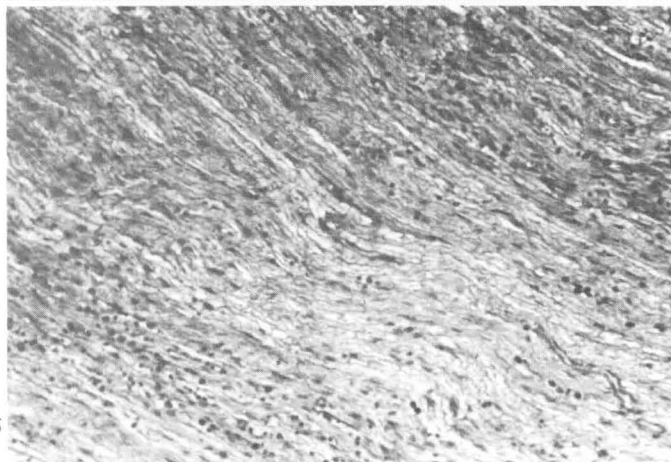
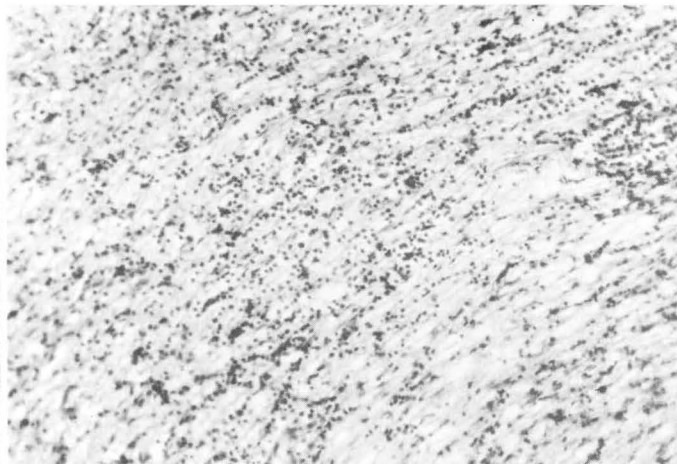
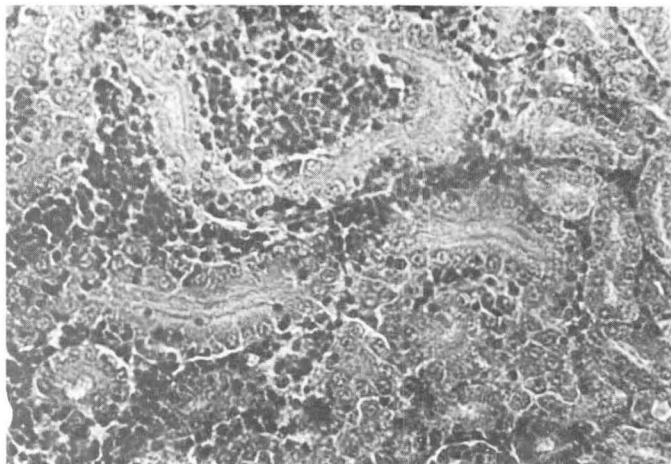


Fig. 3. Corte histológico de rim de uma ave inoculada com o VDM mostrando uma infiltração de células mononucleares entre os túbulos renais. H.-E., 200x.

Fig. 4. Corte histológico de nervo do plexo ciático de ave inoculada com o VDM mostrando uma infiltração difusa de linfócitos, plasmócitos e linfócitos e edema internerveal característicos de uma lesão mista do tipo AB. H.-E., 100x.

Fig. 5. Corte histológico de nervo do plexo ciático de ave inoculada com o VDM mostrando edema internerveal, proliferação de células de Schwann, linfócitos médios e pequenos e plasmócitos. Lesão classificada como tipo B. H.-E., 100x.

Fig. 6. Corte histológico de nervo do plexo ciático de ave inoculada com o VDM mostrando infiltração focal de pequenos linfócitos e proliferação de células de Schwann. Lesão classificada como tipo C. H.-E., 100x.

Fig. 7. Corte histológico de gônada de ave inoculada com o VDM mostrando infiltração de células mononucleares. H.-E., 100x.

Fig. 8. Corte histológico de bursa de Fabricius de ave inoculada com o VDM mostrando despovoamento linfóide e degeneração cística dos folículos bursais. H.-E., 60x.

sendo do tipo A, B, C, ou uma combinação delas (Fig. 4, 5 e 6), conforme Payne e Biggs (1967). Despovoamento linfóide e degeneração cística dos folículos foram observados no timo de uma ave inoculada de 10 semanas de idade, enquanto que, nas gônadas foi observada uma infiltração de plasmócitos, linfócitos, linfoblastos e células de Marek (Fig. 7). Lesões caracterizadas por despovoamento linfóide e degeneração cística dos folículos bursais, assim como infiltração mononuclear interfolicular foram visualizadas na bursa de Fabricius de aves inoculadas de 10 e 12 semanas de idade (Fig. 8).

Lesões microscópicas nos tecidos das aves em contato com as aves inoculadas foram observadas nos rins de uma ave com 6 semanas, na pele de uma ave com 8 semanas e nos nervos de aves com 10 semanas.

Pequenos focos linfóides foram observados em algumas amostras de cérebro e fígado, independentemente da infecção com o VDM. Estes focos eram exclusivamente constituídos de pequenos linfócitos. Todas as aves testemunhas mantiveram-se livres de lesões microscópicas, atribuídas ao VDM, durante o transcurso do experimento (Quadro 4).

DISCUSSÃO

No presente trabalho, apesar de terem sido selecionadas matrizes livres de anticorpos no soro, comumente ensaiados na prova de imunodifusão (Chubb & Churchill 1968), anticorpos precipitantes de origem materna foram detectados no soro de algumas aves de uma semana de idade, mas não no soro de aves com duas semanas. Estes achados são basicamente explicados pelo fato da prova de imunodifusão, apesar de ser altamente específica para o VDM, não é tão sensível como por exemplo a prova de imunofluorescência (Purchase & Burgoyne 1970). Algumas matrizes "falsamente negativas" poderiam ter concentrado os anticorpos para o VDM na gema do ovo, os quais quando absorvidos pelos pintos recém-nascidos, foram detectados com uma semana de idade. Os anticorpos neutralizantes de origem materna, poderiam ter interferido com o rápido estabelecimento e disseminação da infecção nas aves inoculadas, o que poderia ter sido responsável pela baixa proporção de aves com anticorpos precipitantes quatro semanas após a inoculação experimental. Este fenômeno poderia ter-se agravado nas aves em contato com as aves inoculadas, devido a natureza quantitativamente menor e tardia da agressão natural. A falta de anticorpos contra o VDM nas aves testemunhas demonstraram que as medidas de contenção adotadas no presente estudo, foram suficientes para evitar uma contaminação acidental.

Os estudos de transmissão experimental com a cepa do VDM utilizada nestes experimentos, demonstraram que esta cepa induziu a formação de anticorpos, os quais foram detectados em algumas aves a partir da quarta semana após a inoculação intra-abdominal, encontrando-se estes às 12 semanas de idade em 100% das aves inoculadas e em contato.

Os resultados das provas de imunofluorescência indicaram que a cepa do VDM estudada replica-se inicialmente em células mononucleares, provavelmente em linfócitos. Apesar da fluorescência ter sido observada no baço das aves experimen-

talmente infectadas tão cedo como uma semana após a inoculação do VDM e daí em diante, até a sexta semana, poucas foram as células nas quais observou-se esta imunofluorescência.

O achado de imunofluorescência no timo de aves infectadas somente uma semana após a infecção experimental e a sua total ausência até a 12ª semana, poderia indicar que este órgão permitiria uma replicação inicial do VDM porém, sendo logo a infecção rechaçada deste tecido. Por outro lado, a bursa de Fabricius parece fornecer continuamente as células-alvo necessárias para a replicação do VDM, desde que a imunofluorescência foi positiva até a 12ª semana, nas aves inoculadas. Esta fluorescência foi também detectada em aves de quatro semanas de idade, em contato com as aves inoculadas, o que indica que estas aves, apesar de não terem desenvolvido anticorpos, já estavam infectadas. Evidência similar de replicação de cepas do VDM, tais como a JM e a RPL 39, foi obtida por Purchase (1970), que demonstrou antígeno viral na bursa de Fabricius, cinco dias após a inoculação e daí em diante, esporadicamente, até o último teste às seis semanas. Já este pesquisador, visualizou fluorescência no timo também esporadicamente, entre a primeira e sexta semana após a inoculação, enquanto que poucas aves inoculadas possuíam células fluorescentes no baço. Estas diferenças na localização de antígenos virais, poderiam indicar propriedades de tropismo celular na replicação viral de cada cepa do VDM. Este raciocínio é reforçado pelo conhecimento da existência de cepas com tropismo neural (Sevoian et al. 1962) e visceral (Eidson & Schmittle 1968).

A negatividade das impressões de cérebro e fígado, indicam que estes órgãos não participam da patogenia da infecção da cepa estudada. Resultados idênticos foram obtidos por Purchase (1970) após a infecção com a cepa neural JM. As impressões de pele e os esfregaços de sangue forneceram resultados equívocos de imunofluorescência, devido à fluorescência não específica das células componentes destes tecidos.

Extratos de órgãos e tecidos de aves infectadas com a cepa do VDM, continham algumas vezes anticorpos específicos detectáveis na prova de imunodifusão. Assim, o baço, a bursa de Fabricius, as gônadas, os rins e o timo de aves inoculadas de 10 e 12 semanas de idade, reagiram com uma linha de precipitação quando confrontados com os antígenos de referência. Estes anticorpos parecem ser específicos para o antígeno "A" produzido por células infectadas com o HVT ou com o VDM (Chubb & Churchill 1968). O significado da presença desses anticorpos nos tecidos de aves infectadas com o VDM, é por enquanto desconhecido desde que, este fenômeno jamais tinha sido descrito. A origem dos mesmos e a localização dentro de cada um dos tecidos são também desconhecidos e futuras pesquisas nesta área, poderão fornecer informações sobre uma possível participação da imunidade humoral ou de complexos imunes, localizados nestes tecidos, no desenvolvimento do processo tumoral. A presença de anticorpos em órgãos como o baço e os rins poderia ser simplesmente explicada, pela rica vascularização destes órgãos e alto conteúdo de imunoglobulinas no sangue circulante. Já no caso da bursa de Fabricius, gônadas, pontas das penas e timo, esta explicação é altamente improvável devido às características diferentes destes tecidos. Nós

hipotetizamos que a presença destes anticorpos poderia obedecer ao estabelecimento de complexos imunes, que eventualmente resultarão no aparecimento de um processo inflamatório de natureza linfo-proliferativa e que poderia se tornar tumoral, devido a persistência da reação imune.

Sintomas clínicos característicos da doença de Marek foram observados somente em quatro aves, provavelmente devido a natureza do desenho experimental, que não permitiu a manutenção de todas as aves durante as 12 semanas, tempo considerado mais do que suficiente para a expressão da doença de Marek (Spencer 1969). Os sintomas clínicos observados nas quatro aves doentes, foram característicos e correspondiam à forma neural da doença de Marek. Os achados macroscópicos nestas quatro aves, correspondiam a espessamento e perda das estrias dos nervos vago e dos nervos dos plexos braquial e ciático. A especificidade das lesões foi confirmada microscopicamente ao encontrar-se lesões infiltrativas e proliferativas contendo linfócitos de diversos tamanhos, plasmócitos e linfoblastos. Tanto estas lesões como as lesões microscópicas encontradas em algumas aves infectadas, sem sintomas clínicos ou lesões macroscópicas, correspondiam a lesões do tipo A, B, C ou uma combinação delas, previamente descritas por Payne e Biggs (1967). O achado de lesões microscópicas nos nervos somente a partir da quarta semana após a infecção, indicaria que estes tecidos, cronologicamente, não são os primeiros a serem atingidos, desde que lesões microscópicas caracterizadas pela presença de linfócitos, plasmócitos e linfoblastos foram observadas duas semanas após a infecção experimental, tanto na pele como nos rins. O epitélio dos folículos das penas parece ser o único local de replicação completa do VDM (Calnek et al. 1970) e desta forma, o achado de lesões a nível de pele é facilmente explicável. Por outro lado, as infiltrações de células mononucleares entre os túbulos renais, sugeriria um certo grau de lesão renal, talvez mediada por anticorpos, os quais estavam presentes em extratos dos rins destas aves. A cepa do VDM estudada parece ser pouco patogênica e com limitado efeito citolítico sobre o baço, a bursa de Fabricius e o timo, órgãos linfóides geralmente atingidos durante as primeiras semanas de infecção.

Conclui-se que o VDM avaliado na presente pesquisa, produz sintomas clínicos, lesões macro e microscópicas, características da forma neural da doença de Marek, estimula o desenvolvimento de anticorpos no soro, dissemina-se horizontalmente infectando aves em contato e nas aves infectadas, dá origem a antígenos virais e anticorpos detectáveis em extratos de seus tecidos, utilizando-se a prova de imunofluorescência e de imunodifusão, respectivamente.

Agradecimentos.- Agradecemos a Cenira Pereira de Almada e Antônio Lúcio Gomes de Souza pela valiosa assistência técnica e ao Prof. Francisco Rangel Filho pela revisão deste manuscrito.

REFERÊNCIAS

- Bülow V. von & Biggs P.M. 1975. Precipitating antigens associated with Marek's disease viruses and a herpesvirus of turkeys. *Avian Pathol.* 4: 147-162.
- Calnek B.W., Addinger H.K. & Kahn D.E. 1970. Feather follicle epithelium: A source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian Dis.* 14: 219-233.
- Calnek B.W. & Witter R.L. 1978. Marek's disease. In: *Diseases of Poultry*. 7ª ed., p. 385-418.
- Chubb R.C. & Churchill A.E. 1968. Precipitating antibody associated with Marek's disease. *Vet. Rec.* 83: 4-7.
- Churchill A.E. & Biggs P.M. 1967. Agent of Marek's disease in tissue culture. *Nature* 215: 528-530.
- Eidson C.S. & Schmittle S.C. 1968. Studies on acute Marek's disease. I. Characteristics of isolate GA. *Avian Dis.* 12: 467-476.
- Marek J. 1907. Multiple Nervenentzündung (Polyneuritis) bei Hühnern. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 15: 417-421.
- Nazerian K., Solomon J.J., Witter R.L. & Burmester B.R. 1968. Studies on the etiology of Marek's disease. II. Finding of a herpesvirus in cell culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 127: 177-182.
- Payne L.N. & Biggs P.M. 1967. Studies on Marek's disease. II. Pathogenesis. *J. Nat. Cancer Inst.* 39: 281-302.
- Purchase H.G. 1970. Virus-specific immunofluorescent and precipitin antigens and cell-free virus in the tissues of birds infected with Marek's disease. *Cancer Res.* 30: 1898-1908.
- Purchase H.G. 1973. Fluorescent-antibody techniques in avian research. *Avian Dis.* 17: 213-226.
- Purchase H.G. & Biggs P.M. 1967. Characterization of five isolates of Marek's disease. *Res. Vet. Sci.* 8: 440-449.
- Purchase H.G. & Burgoyne G.H. 1970. Immunofluorescence in the study of Marek's disease: Detection of antibody. *Am. J. Vet. Res.* 31: 117-123.
- Sevoian M., Chamberlain D.M. & Counter F.T. 1962. Avian lymphomatosis. I. Experimental reproduction of the neural and visceral forms. *Vet. Med.* 57: 500-501.
- Solomon J.J. 1975. Preparation of avian cell cultures. *Tiss. Cult. Ass. Man.* 1: 7-11.
- Solomon J.J., Witter R.L., Nazerian K. & Burmester B.R. 1968. Studies on the etiology of Marek's disease. I. Propagation of the agent in cell culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 127: 173-177.
- Spencer J.L. 1969. Marek's disease herpesvirus: In vivo and in vitro infection of kidney cells of different genetic strains of chickens. *Avian Dis.* 13: 753-761.
- Stone H.A. 1975. Use of highly inbred chickens in research. *A.R.S., U.S.D.A., Technical Bulletin* 1514, p. 1-22.
- Weisman J. & Hitchner S.B. 1978. Infectious bursal disease virus infection attempts in turkeys and Coturnix quail. *Avian Dis.* 22: 604-609.
- Witter R.L. 1982. Protection by attenuated and polyvalent vaccines against highly virulent strains of Marek's disease virus. *Avian Pathol.* 11: 49-62.
- Witter R.L. & Burmester B.R. 1979. Differential effect of maternal antibodies on efficacy of cellular and cell-free Marek's disease vaccines. *Avian Pathol.* 8: 145-156.
- Witter R.L., Nazerian K., Purchase H.G. & Burgoyne G.H. 1970. Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus. *Am. J. Vet. Res.* 31: 525-538.
- Witter R.L., Sharma J.M. & Fadly A.M. 1980. Pathogenicity of variant Marek's disease virus isolants in vaccinated and unvaccinated chickens. *Avian Dis.* 24: 210-232.