JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی/ دوره هفدهم، شماره اول، ۱۴۰۰، پیاپی ۴۲: ۴۷-۳۹

مقاله پژوهشی

خصوصیات مولکولی و فیلوژنتیکی ویروس بیماری مارک شناسایی شده از گله های جوجه گوشتی کشور

نوید مبشری[۱]، هادی حق بین نظرپاک[۲*]، حسین حسینی[۳]

۱- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی ، گرمسار، ایران

۲- استادیارگروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران

۳- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۱۳

چکیده

بیماری مارک از یکی بیماریهای بسیار مهم صنعت طیور می باشد که توسط هرپس ویروس ماکیان ۲ ایجاد می شود. بیماری مارک در گله های طیور منجر به خسارات اقتصادی سنگین می شود. علیرغم گزارشات متعدد از شیوع بیماری مارک در کشور، گزارش منتشر شده ای از خصوصیات مولکولی و فیلوژنتیکی ویروس مارک در دسترس نمی باشد. لذا هدف از این مطالعه شناسایی مولکولی سروتیپ یک ویروس مارک در گله های گوشتی و تعیین هویت ویروس با استفاده از تعیین توالی ژن *meq* می باشد. بدین منظور به صورت تصادفی از ۳۰ گله مرغ گوشتی کشتار شده در کشتارگاه های استان های خراسان رضوی، اصفهان و تهران نمونه اخذ گردید.ازهر گله به صورت تصادفی ده نمونه طحالی انتخاب شد . نمونه های طحال در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. ابتدا حضور سروتیپ یک ویروس مارک با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توسط آزمایش PCR بررسی گردید. که ۱۲ گله از ۳۰ گله (۴۰٪) مورد بررسی مثبت بودند. در ادامه توالی اسید آمینه پروتئین Meq (از پروتئین های مهم دخیل در انکوژنیسیته) پنج ویروس از ویروسهای شناسایی شده مارک در گله های مثبت تعیین گردید. آنالیز فیلوژنی پنج ویروس مارک شناسایی شده از گله های گوشتی کشور نشان داد که این ویروسها متمایز از ویروس واکسن (Rispens) می باشد و شباهت بسیار زیادی با ویروسهای بسیار بیماریزای مارک از کشورهای عراق، هند و لهستان دارد. نتایج این مطالعه نشان دهنده گردش ویروسهای انکوژن بیماری مارک در مزارع گوشتی کشور است. با توجه به نقش ویروس مارک در کاهش راندمان گله و تضعیف ایمنی، بکارگیری تدابیر پیشگیری بویژه استفاده از واکسن در گله های گوشتی کشور اجتناب ناپذیر می باشد.

کلمات کلیدی: ویروس بیماری مارک، فیلوژنی، گله طیور گوشتی، ایران

*نویسنده مسئول: هادی حق بین نظرپاک

آدرس: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار

پست الکترونیک : h.haghbin@iau-garmsar.ac.ir

مقدمه

بیماری مارک (Marek's disease) یکی از بیماریهای مهم طیور می باشد و اهمیت اقتصادی فروانی دارد. برآورد خسارات سالیانه ناشی از بیماری مارک به صنعت طیور جهان حدود دو میلیارد دلار می باشد(۱۱). ویروس بیماری مارک، بسیار واگیردار و تحت عنوان هرپس ویروس ماکیان ۲ (Gallid herpesvirus 2) نامگذاری شده است و به همراه هرپس ویروس ماکیان ۳ و هرپس ویروس بوقلمون ۱ در جنس Mardivirus طبقه بندی می‌شوند(۱۰).

ژنوم ویروس بیماری مارک مولکول DNA خطی دو رشته‌ای است که در داخل نوکلئوکپسید شش وجهی قرار گرفته‌است و کد کننده بیش از ۲۰۰ ژن منجمله چندین ژن دخیل در پاتوژنز و انکوژنز از جمله *meq* می باشند. ژن *meq* در ترانسفورماسیون و ایجاد تومور در سلولهای T نقش دارد اما در تکثیر ویروس دخیل نیست. پروتئین Meq در تمامی سلولهای توموری مارک حضور دارد. ویروسهای فاقد ژن *meq* انکوژن نمی باشند این ژن در سروتیپ های دو و سه حضور ندارد. حذف این ژن از ویروسهای بیماریزای مارک منجر به از دست رفتن توانایی تومورزایی خواهد شد. لذا فقط سروتیپ یک قادر به ایجاد بیماری در ماکیان می باشد و دو سروتیپ دیگر غیربیماریزا بوده و بعنوان واکسن استفاده می شوند (۱۰).

حدت ویروسهای سروتیپ یک از ملایم تا بسیار بیماریزا متفاوت می باشد. تکثیر ویروس همراه با تضعیف سیستم ایمنی می باشد. ویروسهای سروتیپ یک ممکن است باعث بروز تومور در بافتهای مختلف منجمله اعصاب محیطی، پوست و احشاء شوند(۱۰). کنترل بیماری براساس استفاده از واکسن زنده بهمراه بکارگیری تدابیر امنیت زیستی می باشد. بیماری مارک در گله های گوشتی با تظاهرات بالینی شامل تومورهای جلدی و احشایی همراه است و یکی از دلایل مهم ضبط کشتارگاهی می باشد. در بسیاری کشورها نظیر آمریکا به منظور پیشگیری از خسارات اقتصادی بیماری مارک در گله های گوشتی از واکسن مارک استفاده می شود (۹، ۱۰) .

در حال حاضر در کشور از واکسن دوگانه مارک برای پیشگیری از بیماری مارک در گله های مادر و تخمگذار استفاده می شود ولی در گله های گوشتی کشور هیچ واکسن مارکی استفاده نمی شود. گزارشات متعددی از بروز موارد بالینی و آزمایشگاهی بیماری مارک در کشور منتشر شده است (۱، ۲، ۳، ۵). علیرغم گزارش وقوع تومور در گله های مختلف تجاری و شناسایی مولکولی آن هنوز گزارشی از خصوصیات مولکولی و توالی ژنوم ویروس مارک منتشر نشده است. همچنین با توجه احتمال گردش ویروسهای سویه های واکسن در گله های غیر واکسینه، تعیین خصوصیات مولکولی ویروسهای شناسایی شده اهمیت زیادی دارد. لذا هدف این مطالعه، شناسایی ویروس مارک و سپس تعیین توالی ژن *meq* تعدادی از ویروس های سروتیپ یک مارک در کشور و مقایسه با سویه های و پاتوتیپ های مختلف ویروس مارک می باشد.

روش کار:

نمونه برداری: با توجه به امکانات و توانمندی محققین در گام اول، مطالعه در سه استان خراسان رضوی، سمنان و تهران انجام پذیرفت. بدین نحو که نمونه های طحال به صورت تصادفی از ۳۰ گله گوشتی کشتار شده در کشتارگاههای استان های مذکور و از هر گله ۱۰ نمونه طحالی اخذ گردید که نمونه گیری طحال هم با روش تصادفی صورت پذیرفت. نمونه های

طحال در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. پرندگان انتخاب شده فاقد هر گونه علائم بالینی و ضایعات مرتبط درگیری با ویروس مارک در طحال یا سایر اندام ها بودند. شایان ذکر است که امکان دسترسی به سابقه ی عملکردی گله های گوشتی مذکور میسر نشد.

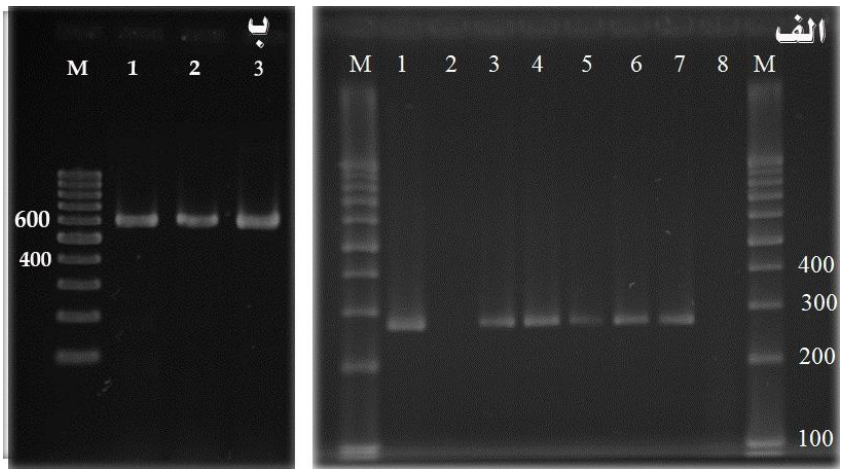
استخراج DNA: در آزمایشگاه با استفاده از کیت تجاری (CinnaPure DNA، سیناکلون) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت، DNA از بافت طحال استخراج شد. DNA تا زمان انجام واکنش PCR در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

واکنش PCR برای شناسایی ویروس سروتیپ یک مارک: واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی سروتیپ یک (جدول ۱) ویروس مارک (۶) و اضافه کردن ۲ µl از DNA به PCR Master Mix (شرکت سیناکلون) طبق برنامه دمایی ۹۵ درجه سانتیگراد ۵ دقیقه، ۴۰ سیکل دمایی ۹۵ درجه سانتیگراد ۲۰ثانیه، ۵۵ درجه سانتیگراد ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد ۲۰ ثانیه و در پایان ۷۲ درجه بمدت ۵ دقیقه قرار گرفت. اندازه محصول PCR در این مرحله ۲۴۷ جفت باز می باشد(شکل ۱). در تمامی مراحل از کنترل های مثبت و منفی جهت تأیید صحت آزمون مولکولی استفاده شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

پرایمر	ژن	توالی (3-5)	طول محصول PCR
اختصاصی سروتیپ یک	ICP4	GGA TCG CCC ACC ACG ATT ACT ACC ACT GCC TCA CAC AAC CTC ATC TCC	۲۴۷ جفت باز
اختصاصی ژن meq	*meq*	ATT CCG CAC ACT GAT TCC AGC AAT GTG GAG CGT TAG	۶۰۰ جفت باز

واکنش PCR بر روی ژن *meq*: پس از مرحله اول PCR و شناسایی سروتیپ یک ویروس مارک در طحال گله های گوشتی، پنج نمونه مثبت از پنج گله مثبت مختلف جهت آنالیز بیشتر و تعیین توالی ژن *meq* انتخاب گردید. جهت انجام واکنش PCR از پرایمرهایی (۱۲)استفاده شد که بطور اختصاصی به ژن *meq* ویروس مارک متصل شده و قطعه به طول ۶۰۰ نوکلئوتید تکثیر می کنند (شکل ۱). این ژن فقط در سروتیپ یک حضور دارد.



شکل ۱: محصول PCR بر روی ژل آگاروز؛ الف: قطعه ۲۴۷ جفت بازی اختصاصی سرتیپ یک. (M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: کنترل مثبت، ۲: کنترل منفی، ۳ تا ۸ نمونه اخذ شده از کشتارگاه. ب: قطعه ۶۰۰ جفت بازی ژن meq (M: مارکر، ۱: کنترل مثبت، ۲و ۳: دو نمونه اخذ شده از کشتارگاه

تعین توالی ژن *meq*: محصول PCR به‌منظور حذف نوکلئوتیدهای اضافی آزاد و بقیه مواد مصرف نشده توسط کیت PCR Purification Kit Roche خالص‌سازی و تغلیظ شد. محصول PCR خالص شده و به منظور تعیین توالی به صورت دو طرفه به آزمایشگاه Bioneerکره جنوبی ارسال شد. تعیین توالی توسط ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit و به روش اتوماتیک انجام گرفت.

آنالیز ژن *meq*: با توجه به اینکه توالی نمونه ها به صورت دو طرفه و از هر دو رشته ی Forward و Reverse صورت گرفته بود، جهت آنالیز، در ابتدا از توالی رشته ی Reverse رشته ی مکمل و معکوس تهیه شد. به منظور مقایسه توالی نوکلئوتیدی ویروس های سکانس شده در این مطالعه با سایر ویروس های مارک و همچنین شناسایی ژنوتیپ آن توسط نرم افزار Mega (۷) توالی نوکلئوتیدی ژن *meq* تعدادی از ویروس های مارک مختلف موجود در Gene bank کسب شد.

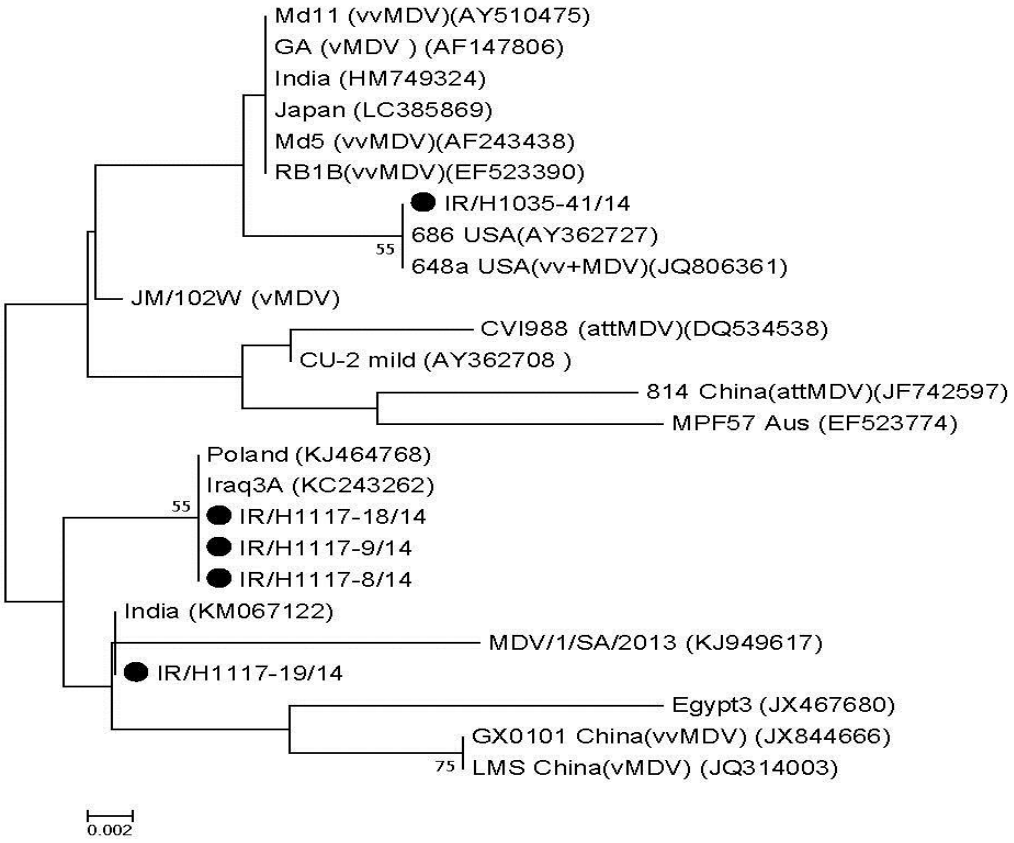
سپس Multiple Alignment با بهره گیری از روش CLUSTAL W بر روی تمام توالیهای نوکلئوتیدی اخذ شده صورت گرفت. سپس توالی نوکلئوتیدی بر اساس کدهای معادل به اسید آمینه های متناظر ترجمه و توالی اسید آمینه به صورت همزمان با توالی نوکلئوتیدی مورد ارزیابی قرار گرفت. آنالیز فیلوژنی بر اساس توالی نوکلئوتیدی و با استفاده روش neighbor joining و با بهره گیری از مدل Tamura-NEI در نسخه ۷ نرم افزار Mega انجام شد(۷).

اعتبار و صحت درخت فیلوژنی با روش bootstrapping و منظور نمودن ۱۰۰۰ تکرار ارزیابی شد.

نتایج:

انجام واکنش PCR بر روی DNA استخراج شده از طحال با پرایمرهای اختصاصی سروتیپ یک مارک، باند ۲۴۷ جفت بازی را ایجاد کرد. از مجموع ۳۰ گله آزمایش شده ۱۲ گله (۴۰٪) از نظر حضور مارک سروتیپ یک، مثبت شدند. پنج ویروس از ویروسهای شناسایی شده در این مرحله جهت تعیین توالی ژن *meq* انتخاب شدند. پس از انجام PCR قطعه ۶۰۰ نوکلئوتید توالی یابی شد. آنالیز و مقایسه ژن *meq* پنج ویروس شناسایی شده از گله های گوشتی مذکور با ۲۰ ویروس استاندارد دنیا انجام شد. براساس درخت فیلوژنی ویروسهای مارک شناسایی شده در این مطالعه همگی با

ویروسهای حاد و بسیار حاد مارک گزارش شده از کشورهای عراق، عربستان، هند و آمریکا مشابهت کامل داشته است (شکل ۲). در این میان ویروس IR/H1035-41/14با سویه های ۶۸۶ و ۶۴۸ که از سویه های بسیار حاد شناسایی شده در آمریکا شباهت داشته است. هر پنج ویروس شناسایی شده با ویروس مارک سویه واکسینال سروتیپ یک (Rispens) و سویه هایی با بیماریزایی ملایم نظیر (CU-2) متفاوت بودند.



شکل ۲: درخت فیلوژنی براساس پروتئین Meq. ویروسهای شناسایی شده در این مطالعه با دایره سیاه مشخص شده اند. کد دسترسی بانک ژنی ویروسهای استاندارد و سایر ویروسهای موجود در درخت فیلوژنی مشخص شده است.

بحث

بیماری مارک از بیماریهای مهم صنعت طیور می باشد. جهت پیشگیری استفاده از واکسن مارک از دهه ۱۹۷۰ آغاز گردید. سویه های مارک در ابتدا بیماریزایی ملایم داشتند. به تدریج و بدلیل فشار ایمنی سویه های مارک تغییر بیماریزایی داده و حدت بیشتر پیدا کردند که منجر به تغییر واکسن و استفاده از واکسن سروتیپ یک و یا واکسن های دوگانه شد(۱۱، ۱۵، ۱۷). همچنین با افزایش شیوع بیماری مارک در گله های گوشتی، برخی از کشورها استفاده از واکسن جهت پیشگیری از عوارض اقتصادی را در برنامه خود قرار دادند.

استفاده از واکسنهای زنده مارک در گله های تخمگذار و مادر کشور در جوجه کشی ها برنامه متداول پیشگیری از بیماری مارک در کشور می باشد. به هرحال هنوز استفاده از واکسن مارک در گله های گوشتی کشور متداول نیست. در طی سالهای گذشته موارد متعددی از شیوع بیماری مارک در گله های گوشتی گزارش شده است(۱، ۵ و ۸). در بررسی ۲۲ گله های گوشتی سه استان تهران، اصفهان و مشهد،

۱۴ گله (۶۳/۳%) در آزمون PCR ویروس مارک مثبت بودند درحالیکه تنها ۶ گله (۲۷/۳٪)شواهد میکروسکوپی مارک را نشان می دادند(۱). در مطالعه اخیر ویروس بیماری مارک در ۴۰ درصد از گله های گوشتی نمونه بردای شده حضور داشت. نمونه ها از نظر پاتولوژی ارزیابی نشدند اما به نظر میرسد شیوع ویروس مارک بیشتر از مواردی است که بصورت ماکروسکوپی و یا میکروسکوپی قابل مشاهده باشد. هرچند از تمام موارد توموری مشاهده شده در کشتارگاه طیور نیز ویروس مارک جدا نشده است (۵) ویروس مارک ایجاد عفونت سیتولیتیک در سلولهای T و B می نماید و با تضعیف ایمنی حساسیت به سایر بیماریها را افزایش می دهد. به همین دلیل یکی از عوامل تضعیف کننده ایمنی می باشد. شیوع ویروس بیماری مارک در مزارع پرورش گله های گوشتی می توانند بعنوان عامل تضعیف کننده سیستم ایمنی عمل کرده و در تشدید بیماری دیگر نقش ایفاء کند(۷).

سه ژن *meq* ، *pp*38 و *VIL*-8 بیشتر از سایر ژنهای ویروس مارک مورد مطالعه قرار گرفته اند که در بین اینها ژن *meq* بیشتر مورد توجه محققین بوده است زیرا ژن اصلی در انکوژنیسیته ویروس می باشد. همچنین تفاوت ژن *meq* بین سویه های واکسینال سروتیپ یک و سویه های بیماریزا ویروس مارک منجر به تمایل بیشتر در استفاده از این ژن جهت مطالعات اپیدمیولوژی شده است(۱۵، ۱۷). براساس نتایج آنالیز ژن *meq* پنج ویروس ایران در سه شاخه جداگانه قرار گرفته اند که بیانگر تنوع ویروس مارک در ژن *meq* می باشد. سایر مطالعات نیز بیانگر پلی موفوریسم ژن *meq* در ویروس های مارک در حال گردش در یک منطقه می باشد (۴، ۱۱). موتاسیونهای نقطه ای و تنوع در ژن *meq* با انکوژنیسیته بیشتر در ارتباط است (۹). امکان تعیین پاتوتیپ ویروس بیماری مارک براساس درخت فیلوژنی وجود ندارد(۱۱). براساس درخت فیلوژنی پروتئین Meq در سه ویروس در حال گردش کشور با ویروسهای گزارش شده از عراق (۱۴) و لهستان (۱۵) و آمریکا در یک گروه قرار دارند. نمونه های مورد بررسی در این مطالعه از سویه واکسینال کشور متمایز و شبیه سویه بیماریزای گزارش شده ازکشورهایی نظیر عراق، لهستان و هند می باشد(جدول-۲). به هرحال احتمال گردش چندین پاتوتیپ در یک منطقه وجود دارد (۸،۴). در این مطالعه سویه واکسینال Rispens شناسایی نشد، در حالیکه این واکسن سالها در گله های تخمگذار و مادر در حال استفاده می باشد. به نظر می رسد که عمده ویروس شناسایی شده در مطالعات دیگر نیز از گروه بیماریزای ویروس مارک می باشند. گزارشات قبلی نیز بیانگر سرعت انتشار بسیار کند سویه Rispens بوده است (۱۴).

با توجه به دوره نگهداری کوتاه مدت گله های گوشتی (۴۲-۳۵ روز) احتمال بروز بیماری بالینی مارک کم است به ویژه در مزارعی که قبل از ورود جوجه یکروزه مرحله پاکسازی و ضدعفونی مناسب اجراء می شود احتمال چالش با ویروس مارک کاهش پیدا می کند. بهمین دلیل برخی از کشورها نظیر ایران برنامه تجویز واکسن مارک در گله های گوشتی بکار نمی رود. در حالیکه در کشورهایی که نظیر آمریکا که از بستر دوره قبل استفاده می شود احتمال چالش با ویروس در روزهای اول زندگی بیشتر بوده و جوجه های گوشتی بصورت تزریق داخل تخم مرغی بر علیه مارک واکسینه می شوند (۱۷). به هرحال مشخص شده است که در ویروس بیماری مارک حتی در غیاب بیماری بالینی مارک (تومور) بر روی رشد و عملکرد گله اثرات زیانباری دارد (۱۵،۱۳).

جدول ۲: درصد تشابه در آسید آمینه ژن meq ویروسهای مارک شناسایی شده در این مطالعه و تعدادی از ویروسهای استاندارد

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	IR/H1035-41/14																
2	IR/H1117-8/14	98.4															
3	IR/H1117-19/14	97.6	99.2														
4	JM/102W_(vMDV)	98.4	98.4	99.2													
5	Md5_(vvMDV)(AF243438)	99.2	97.6	98.4	99.2												
6	CVI988 (DQ534538)	96.8	96.8	97.6	98.4	97.6											
7	India_(HM749324)	99.2	97.6	98.4	99.2	100	97.6										
8	CU-2_mild(AY362708)	97.6	97.6	98.4	99.2	98.4	99.2	98.4									
9	Iraq3A (KC243262)	98.4	100	99.2	98.4	97.6	96.8	97.6	97.6								
10	648a (vv+MDV)(JQ806361)	100	98.4	97.6	98.4	99.2	96.8	99.2	97.6	98.4							
11	Md11_(vvMDV)(AY510475)	99.2	97.6	98.4	99.2	100	97.6	100	98.4	97.6	99.2						
12	GA_(vMDV_)(AF147806)	99.2	97.6	98.4	99.2	100	97.6	100	98.4	97.6	99.2	100					
13	GX0101 (vvMDV)_(JX844666)	96	97.6	98.4	97.6	96.8	96	96.8	96.8	97.6	96	96.8	96.8				
14	814 (attMDV)(JF742597)	96	96	96.8	97.6	96.8	97.6	96.8	98.4	96	96	96.8	96.8	96.8			
15	MDV/1/SA/2013_(KJ949617)	96	97.6	98.4	97.6	96.8	96	96.8	96.8	97.6	96	96.8	96.8	96.8	95.2		
16	MPF57 (EF523774)	96	96	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	97.6	96	96	96.8	96.8	96.8	97.6	95.2	
17	Egypt3_(JX467680)	95.2	96.8	97.6	96.8	96	95.2	96	96	96.8	95.2	96	96	97.6	94.4	96	94.3

نتیجه گیری

بطور کلی یافته این مطالعه نشان داد که شیوع ویروس بیماری مارک در گله های گوشتی کشور که سالهای گذشته گزارش شده بود همچنان ادامه دارد و برای اولین بار مشخص شد این ویروسها براساس توالی ژن *meq* شبیه ویروسهای بیماریزای مارک و متمایز از سویه واکسینال می باشد. با توجه به تداوم افزایش بیماریزایی ویروس مارک در سراسر دنیا، به نظر می رسد به کارگیری واکسن مارک در گله گوشتی اجتناب ناپذیر باشد.

منابع

۱) فرهود، م. طرقی، ر. ملکی، م. باسامی، م. ر. کیانی زاده، م. چرخکار، س. (۱۳۸۶) بیماری مارک در مرغهای گوشتی استانهای خراسان، اصفهان و تهران. *پاتوبیولوژی مقایسه ای*. ص ۱۳۸-۱۳۳

۲) قریشی، س. ع. صادقی، م. قائم مقامی، س. ش. عزی، ع. کارگرموخر، ر., صالحی تر. (۱۳۸۴) تشخیص ویروس بیماری مارک در طیور گوشتی با استفاده از روش های آسیب شناسی و Nested-PCR. *چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران*; کرمان

۳) محمدی،ع, کیوانفر، ه. همت زاده، ف. بزرگمهری فرد، م. ح. (۱۳۸۴), تشخیص مولکولی ویروس عامل بیماری مارک در ایران. *مجله تحقیقات دامپزشکی*. ۶۰ (۲) ص

4) Bell AS, Kennedy DA, Jones MJ, Cairns CL, Pandey U, Dunn PA, Szpara, ML, Read, AF. (2019). Molecular epidemiology of Marek's disease virus in central Pennsylvania, USA. *Virus evolution*, **5**: vey042.

5) Doosti A, Golshan M. Molecular study for detection of Mareks disease virus (MDV) in southwest of Iran. (2011). *Scientific Research and Essays*, **6**:2560-3.
6) Handberg KJ, Nielsen OL, Jorgensen PH. (2001) The use of serotype 1-and serotype 3-specific polymerase chain reaction for the detection of Marek's disease virus in chickens. *Avian Pathology*, **30**:243-9.
7) Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7. (2016) molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*.**33**:1870-4.
8) Mescolini G, Lupini C, Felice V, Guerrini A, Silveira F, Cecchinato M, Catelli E.(2019) Molecular characterization of the meq gene of Marek's disease viruses detected in unvaccinated backyard chickens reveals the circulation of low- and high-virulence strains. *Poultry Science* **98**:3130–3137
9) Murata S, Hashiguchi T, Hayashi Y, Yamamoto Y, Matsuyama-Kato A, Takasaki S, Isezaki M,Onuma M,Konnai S,Ohashi, Kazuhiko (2013)Characterization of Meq proteins from field isolates of Marek's disease virus in Japan. Infection, *Genetics and Evolution*, **16**:137-43.
10) Nair V. (2018). Spotlight on avian pathology: Marek's disease. *Avian pathology*, **47**:440-2.
11) Nair V. Gimeno I and Dunn J. (2019) Marek's Disease. In: Swayne DE, editor. Diseases of Poultry. 14th ed. Hoboken, NJ 07030, USA: John Wiley & Sons, Inc.;. p. 550-587.
12) Renz KG, Cooke J, Clarke N, Cheetham BF, Hussain Z, Fakhrul Islam A, Tannock, GA,
13) Walkden-Brown SW. (2012) Pathotyping of Australian isolates of Marek's disease virus and association of pathogenicity with meq gene polymorphism. *Avian Pathology*. **41**:161-76.
14) 13-Torres ACD, Marin SY, Costa CS, Martins NRS,(2019) An Overview on Marek's Disease Virus Evolution and Evidence for Increased Virulence in Brazil, *Brazilian Journal of Poultry Science*, **21** : ۱
15) Wajid SJ, Katz ME, Renz KG, Walkden-Brown SW. (2013) Prevalence of Marek's disease virus in different chicken populations in Iraq and indicative virulence based on sequence variation in the EcoRI-Q (*meq*) gene. *Avian diseases*. **57**:562-8.
16) Woźniakowski G, Samorek-Salamonowicz E. (2014) Molecular evolution of Marek's disease virus (MDV) field strains in a 40-year time period. *Avian diseases*, **58**:550-7.
17) Yu Z-H, Teng M, Luo J, Wang X-W, Ding K,Yu L-L, Su JW, Chi JQ, Zhao P, Hu, Bo. (2013) Molecular characteristics and evolutionary analysis of field Marek's disease virus prevalent in vaccinated chicken flocks in recent years in China. *Virus Genes*. **47**:282-91.
18) Zhang Y-p, Liu C-j, Zhang F, Shi W, Li J. (2011) Sequence analysis of the *Meq* gene in the predominant Marek's disease virus strains isolated in China during 2006–2008. *Virus genes*. **43**:353.