



ASOCIACIÓN ESPAÑOLA
DE CIENCIA AVÍCOLA
Sección Española de WPSA
www.wpsa-aeca.es



Miércoles, 28 de octubre, 16.45 h

El Virus de la Enfermedad de Marek y su efecto en el Sistema Inmune

I. M. GIMENO

**College of Veterinary Medicine
North Carolina State University**

Introducción

La enfermedad de Marek (MD) sigue siendo un problema para la industria avícola. El desarrollo de vacunas a finales de los años 60 consiguió controlar lo que entonces era una crisis sin precedentes para la avicultura mundial. Sin embargo, con el tiempo, el virus que causa la MD (MDV) ha incrementado su virulencia, es capaz de producir la enfermedad en animales vacunados y ha adquirido características que le hacen más difícil de controlar. Una de las características más importantes de los virus emergentes es su capacidad inmunosupresora. Los objetivos de esta charla son evaluar la situación actual del MDV y de la MD, actualizar los conocimientos sobre la inmunosupresión causada por el MDV (MDV-IS), y revisar cómo podemos utilizar a nuestro favor la capacidad del MDV para regular el sistema inmune.

Evolución de la enfermedad y situación actual

La MD tal y como la conocemos hoy tiene poco que ver con el fenómeno que describió Josef Marek en 1907 (25). Las primeras descripciones de la enfermedad hacen referencia a un fenómeno patológico de animales adultos, que sólo causa inflamación en los nervios periféricos, sin ninguna relevancia económica (25, 31, 32). A finales de la década de los 50 y a medida que la avicultura se industrializó, la MD pasó de ser un simple hallazgo a ser una de las mayores amenazas para la avicultura mundial. Las lesiones comenzaron a ser tumorales y no sólo afectaba a nervios periféricos sino también a vísceras y piel. Además, MD aparecía en animales mucho más jóvenes y en producción y producía mortalidades muy elevadas (1, 2). El desarrollo de las primeras vacunas a finales de la década de los 60 controló el problema de una manera drástica, pero desafortunadamente, no definitiva. Desde la introducción de las primeras vacunas al día de hoy, la enfermedad y el virus han seguido cambiando. Aparte de seguir causando linfomas en nervios y vísceras, los virus actuales son mucho más neurovirulentos (12), más inmunosupresores (7), y capaces de inducir la enfermedad en animales genéticamente resistentes y/o vacunados (46).

Son varios los factores que contribuyen a la evolución del MDV y de MD. Los primeros cambios en la enfermedad coincidieron con el inicio de la avicultura industrial en la década de 1950. El incremento de densidad de animales en un entorno cerrado pudo contribuir a que el virus evolucionara. El MDV no se pudo aislar hasta finales de los años 60 (8, 28) y desafortunadamente no se tiene ninguna cepa aislada de los periodos anteriores, con lo que es imposible determinar las diferencias genéticas del MDV de los primeros años con los MDV aislados posteriormente. Los siguientes

cambios en virulencia descritos coinciden con la introducción de nuevas vacunas en el mercado y por ello la hipótesis que se baraja es que la vacunación en sí conlleve a la evolución del virus (45). La explicación de esta hipótesis se basa en que las vacunas no protegen frente a la infección y transmisión, sólo frente al desarrollo de tumores. Por lo tanto un animal vacunado sufrirá continuas infecciones con virus de campo durante su vida y aquellos virus que se repliquen mejor en el animal vacunado serán los que se transmitan a otros animales (13). Este modelo es fácil de explicar en USA porque cada una de las evoluciones descritas del MDV ocurre 10-20 años después de la introducción de una nueva vacuna (primero HVT, seguida de HVT+SB-1, y finalmente CVI988). Sin embargo, en Europa y en otras regiones del mundo la cepa CVI988 se ha usado, y sigue usando, desde el año 1972. Se sabe que el virus también ha evolucionado en virulencia en otras regiones del mundo (5, 16, 43), sin embargo no es posible asociar estos cambios a la introducción de nuevas vacunas.

Inmunosupresión causada por el MDV (MDV-IS)

La MDV-IS es muy compleja porque el MDV es capaz de modular la respuesta inmune del animal mediante mecanismos muy diferentes. En general la MDV-IS se divide en dos tipos, una inmunosupresión transitoria asociada a la replicación temprana del virus en los órganos linfáticos que conlleva destrucción de linfocitos y atrofia de la bolsa de Fabricio y del timo (síndromes linfodegenerativos) y una inmunosupresión permanente asociada a la desregulación de la respuesta inmune y la transformación neoplásica de linfocitos T.

La **MDV-IS transitoria** se produce fundamentalmente por la destrucción de los linfocitos B y T debido a la replicación inicial del MDV en los órganos linfáticos. Esta destrucción se produce mediante apoptosis (26, 27) y se asocia a atrofia de los órganos linfáticos que es fácil de detectar tanto macroscópicamente como por histopatología. El grado de destrucción de linfocitos depende de la capacidad de replicación del MDV y está influenciada por el nivel de anticuerpos maternos frente a MDV, el estado de vacunación frente a MD, y la susceptibilidad genética de las aves frente a MD. En aves susceptibles sin anticuerpos maternos frente a MDV, los patotipos vv y vv+ del MDV se replican más y durante periodos más largos que los patotipos m o v e inducen mayor grado de atrofia de la bolsa de Fabricio y del timo. Lo mismo ocurre con vacunas experimentales del serotipo 1 de MDV a las que se les ha eliminado el oncogén *meq* (22, 24, 39) o con cepas de MDV que llevan insertado en su genoma la región LTR (long terminal repeat) del virus de la reticuloendoteliosis (REV) (14, 21, 40, 44). Por otra parte, las vacunas de los serotipos 2 y 3 o la cepa atenuada del serotipo 1 CVI988 se replican a niveles muy bajos en los órganos linfáticos y solo ocasionan mínimas en la bolsa de Fabricio (9). En aves que están vacunadas frente a MD o que tienen anticuerpos maternos frente al MDV, la replicación inicial del virus en los órganos linfáticos es mucho menor y no se produce la atrofia de la bolsa de Fabricio o del timo (34). Dado que todas las aves comerciales tienen anticuerpos maternos frente a MDV y la mayoría se vacuna frente a MD, es muy poco probable que este mecanismo de inmunosupresión se de en condiciones de campo.

La **MDV-IS permanente** ocurre más tarde en la patogénesis y ocurre independientemente del estatus de anticuerpos maternos de las aves. En trabajos recientes hemos demostrado que ocurre incluso en aves vacunadas que están bien protegidas frente al desarrollo de tumores característico de la MD. La MDV-IS permanente es muy compleja y difícil de estudiar. No se relaciona con atrofia de los órganos linfáticos y casi siempre pasa desapercibida en el campo. Las consecuencias económicas de la MDV-IS permanente se desconocen pero es posible que al día de hoy sean tan importantes como las pérdidas asociadas al desarrollo de tumores. Los mecanismos involucrados en la MDV-IS permanente son múltiples y posiblemente muchos de ellos aún se desconozcan. En principio se pueden dividir en

dos grupos, los que están relacionados con el desarrollo de tumores y los que ocurren independientemente del desarrollo de tumores.

Aunque no se conoce exactamente en qué medida los tumores inducen inmunosupresión, hay evidencia de que el desarrollo de tumores se relaciona con MDV-IS permanente (35, 42). Las células tumorales de MD expresan varios antígenos que pueden interferir con la respuesta inmune, tal como el antígeno fetal de pollo que interfiere con la actividad de las células NK y el antígeno CD30 que conduce la respuesta inmune hacia inmunidad Th2 (4, 36). Las células tumorales, además, pueden reducir la expresión del antígeno CD28, que es una molécula co-estimuladora para la activación de los linfocitos T, y por tanto podría ser un mecanismo que utilizan los tumores para evadir al sistema inmune (3). El oncogén meq parece estar involucrado en inmunosupresión de tipo humoral puesto que su delección disminuye la capacidad del MDV de reducir la respuesta humoral conferida por vacunas de influenza aviar y de la enfermedad de Newcastle.

La MDV-IS permanente además ocurre por mecanismos completamente independientes al desarrollo de tumores. MDV es capaz de desregular varios segmentos de la respuesta inmune. Por ejemplo, MDV regula negativamente la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de tipo I (MHC-I) (11, 17), desregula la expresión del MHC de clase II (MHC-II) bien aumentándola(6, 30) o disminuyéndola(23, 41), y aumenta la producción de óxido nítrico (NO) que puede producir apoptosis de linfocitos e inmunosupresión(19). La capacidad del MDV para desregular el sistema inmune depende del patotipo. La infección con cepas vv+MDV induce mayor producción de NO *in vivo* que la infección con cepas vMDV(18). Además, la regulación negativa de la expresión del MHC-I es mayor en animales inoculados con la cepa 648A (vv+MDV) poco atenuada (10 pases en cultivo de fibroblasto de embrión de pollo, CEF) que en animales inoculados con las cepas GA (vMDV) o con 648A atenuada 40 pases en CEF (10).

Repercusión de MDV-IS a nivel de campo. Debido a la complejidad de la interacción del MDV con el sistema inmune de las aves, es muy difícil desarrollar métodos de diagnóstico y control de la MDV-IS. Tradicionalmente se ha pensado que la MDV-IS no es relevante a nivel de campo porque las aves comerciales tienen anticuerpos maternos que protegen frente a la inmunosupresión transitoria asociada a las primeras fases de infección del virus. Por otra parte, una vacunación apropiada podría proteger frente a la MDV-IS permanente asociada a tumores. Sin embargo, recientemente hemos demostrado que en el caso de infección con los virus altamente virulentos (vv+MDV), ni los anticuerpos maternos ni las vacunas que actualmente se emplean para el control de la MD (tumores) protegen frente a la inmunosupresión permanente inducida por el MDV. La inmunosupresión permanente se da en animales comerciales, que no sufren atrofia de los órganos linfáticos e incluso en ausencia de tumores, lo cual complica en gran medida su diagnóstico. En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo para estudiar la MDV-IS permanente no relacionada con el desarrollo de tumores y que afecta únicamente a la respuesta inmune celular. Nuestros resultados demuestran que la infección temprana con un vv+MDV es capaz de abrogar completamente la inmunidad conferida por otras vacunas (i.e. vacunas adaptadas al embrión de pollo de la laringotraqueitis). Las consecuencias de esta MDV-IS permanente a nivel de campo pueden ser muy serias y comprometer los resultados de los programas de vacunación frente a otras enfermedades y los parámetros productivos. Por el momento, la única vacuna capaz de proteger frente a la MDV-IS permanente no asociada a vacunas es una vacuna experimental a la que se le eliminó el oncogén meq (rMd5ΔMEQ). Los resultados son aún preliminares y los mecanismos por los que esta vacuna protege desconocidos. Más estudios son necesarios para desarrollar métodos de diagnóstico y control adecuados.

Las vacunas de MD aceleran el desarrollo del sistema inmune

La capacidad del MDV para regular la respuesta inmune depende de la virulencia de la cepa viral, siendo las más virulentas (vv+) las únicas capaces de inducir MDV-IS en aves comerciales. Sin embargo, cepas de menor virulencia o incluso vacunas también regulan al sistema inmune y es posible usar esta característica a nuestro favor. En estudios recientes hemos demostrado que la vacunación con HVT *in ovo* acelera el proceso de maduración del sistema inmune, de manera que los pollitos al nacer no sólo responde mejor frente a un desafío con MDV sino frente a otras vacunas y/o patógenos no relacionados (15). Los mecanismos por los que HVT acelera el desarrollo del sistema inmune no están del todo elucidados. HVT es capaz de estimular la actividad de las células natural killers cuando se administra *in ovo* (38). En nuestro laboratorio hemos demostrado que la vacunación *in ovo* con HVT resulta en mayor expresión de IFN- γ y de TLR-3 en bazo y pulmón incluso a las 24 horas de la vacunación. El TLR-3 del pollo es homólogo al TLR-3 de mamíferos y cumple funciones similares (37). En las aves, los análogos de moléculas dobles de RNA (dsRNA) activan TLR-3 y su activación estimula la producción de interferón (IFN) de tipo 1 (20). En nuestro estudio, no se detectó incremento en la producción del IFN- α pero sí de IFN- γ . Resultados similares se encontraron en estudios previos cuando aves de un día de edad se inocularon con MDV (33). Recientemente se ha encontrado que algunos virus, incluyendo herpesvirus, son capaces de estimular la producción de IFN- γ mediante la estimulación de TLR-3 mediante un mecanismo aun no elucidado (29). Nuestros resultados sugieren que HVT podría acelerar el desarrollo del sistema inmune del embrión de pollo mediante éste mecanismo. Para poder optimizar éste proceso, se necesitarán más estudios de investigación sobre los efectos de HVT y de otras vacunas de MD en el sistema inmune del embrión.

Referencias

1. BENTON, W.J., AND M.S. COVER. The increased incidence of visceral lymphomatosis in broiler and replacement birds. *Avian Dis.* 1:320-327. 1957.
2. BIGGS, P.M., H.G. PURCHASE, B.R. BEE, AND P.J. DALTON. Preliminary report on acute Marek's disease (fowl paralysis). *Vet. Rec.* 77:1339-1340. 1965.
3. BURGESS, S.C., AND T.F. DAVISON. Identification of the neoplastically transformed cells in Marek's disease herpesvirus-induced lymphomas: Recognition by the monoclonal antibody AV37. *Journal of Virology* 76:7277-7292. 2002.
4. BURGESS, S.C., J.R. YOUNG, B.J. BAATEN, L. HUNT, L.N. ROSS, M.S. PARCELLS, P.M. KUMAR, C.A. TREGASKES, L.F. LEE, AND T.F. DAVISON. Marek's disease is a natural model for lymphomas overexpressing Hodgkin's disease antigen (CD30). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:13879-13884. 2004.
5. BUSCAGLIA, C., P. NERVI, J.L. GARBI, AND M. PISCOPO. Isolation of very virulent strains of Marek's disease virus from vaccinated chickens in Argentina. *Proc. 44th West. Poultry Dis. Conf.*:53-57. 1995.
6. CALNEK, B.W., K.A. SCHAT, L.J.N. ROSS, W.R. SHEK, AND C.L.H. CHEN. Further characterization of Marek's disease virus infected lymphocytes. I. *In vivo* infection. *Int. J. Cancer* 33:389-398. 1984.
7. CALNEK, B.W., R.W. HARRIS, C. BUSCAGLIA, K.A. SCHAT, AND B. LUCIO. Relationship between the immunosuppressive potential and the pathotype of Marek's disease virus isolates. *Avian Diseases* 42:124-132. 1998.
8. CHURCHILL, A.E. Herpes-type virus isolated in cell culture from tumors of chickens with Marek's disease. I. *Studies in cell culture.* *J. Natl. Cancer Inst.* 41:939-950. 1968.

9. **FLETCHER, O.J., C.S. EIDSON, AND S.H. KLEVEN.** Bursal lesions in chickens inoculated with Marek's disease vaccines. *Avian Dis.* 16:153-162. 1972.
10. **GIMENO, I.M., R.L. WITTER, H.D. HUNT, S.M. REDDY, AND U. NEUMANN.** Differential attenuation of the induction by Marek's disease virus of transient paralysis and persistent neurological disease: a model for pathogenesis studies. *Avian Pathol.* 30:397-409. 2001.
11. **GIMENO, I.M., R.L. WITTER, H.D. HUNT, L.F. LEE, S.M. REDDY, AND U. NEUMANN.** Marek's disease virus infection in the brain: virus replication, cellular infiltration and major histocompatibility complex antigen expression. *Veterinary Pathology* 38:491-503. 2001.
12. **GIMENO, I.M., R.L. WITTER, AND U. NEUMANN.** Neuropathotyping: a new system to classify Marek's disease virus. *Avian Dis.* 46:909-918. 2002.
13. **GIMENO, I.M.** Marek's disease vaccines: a solution for today but a worry for tomorrow? *Vaccine* 26 Suppl 3:C31-41. 2008.
14. **GIMENO, I.M., R.L. WITTER, A.L. CORTES, AND W.M. REED.** Replication ability of three highly protective Marek's disease vaccines: implications in lymphoid organ atrophy and protection. *Avian Pathol* 40:573-579. 2011.
15. **GIMENO, I.M., N.M. FAIZ, A.L. CORTES, T. BARBOSA, T. VILLALOBOS, AND A.R. PANDIRI.** In ovo vaccination with HVT fasten maturation of chicken embryos immune responses in Specific Pathogen Free Chickens (SPAFAS). *Avian Diseases.* 2015 (in press).
16. **GIMENO, I.M., M. PIZARRO, AND P. VILLEGAS.** Histopathological study of the flaccid paralysis syndrome in Spanish broiler flocks and its relationship with transient paralysis Marek's disease virus induced. In: *Current Research on Marek's Disease.* R.F. Silva, H.H. Cheng, P.M. Coussens, L.F. Lee and L.F. Velicer, eds. American Association of Avian Pathologists, Inc., Kennett Square, Pennsylvania. pp 98-103. 1996.
17. **HUNT, H.D., B. LUPIANI, M.M. MILLER, I.M. GIMENO, L.F. LEE, AND M.S. PARCELLS.** Marek's disease virus down regulates surface expression of MHV (B complex) class I (BF) glycoproteins during active but not latent infection of chicken cells. *Virology* 282:198-205. 2001.
18. **JAROSINSKI, K.W., R. YUNIS, P.H. O'CONNELL, C.J. MARKOWSKI-GRIMSRUD, AND K.A. SCHAT.** Influence of genetic resistance of the chicken and virulence of Marek's disease virus (MDV) on nitric oxide responses after MDV infection. *Avian Dis.* 46:636-649. 2002.
19. **JAROSINSKI, K.W., B.L. NJAA, P.H. O'CONNELL, AND K.A. SCHAT.** Pro-inflammatory responses in chicken spleen and brain tissues after infection with very virulent plus Marek's disease virus. *Vir. Immunol.* 18:148-161. 2005.
20. **KARPALA, A.J., J.W. LOWENTHAL, AND A.G. BEAN.** Activation of the TLR3 pathway regulates IFN β production in chickens. *Developmental and comparative immunology* 32:435-444. 2008.
21. **KIM, T., J. MAYS, A. FADLY, AND R.F. SILVA.** Artificially inserting a reticuloendotheliosis virus long terminal repeat into a bacterial artificial chromosome clone of Marek's disease virus (MDV) alters expression of nearby MDV genes. *Virus Genes.* 2011.
22. **LEE, L.F., B. LUPIANI, R.F. SILVA, H.J. KUNG, AND S.M. REDDY.** Recombinant Marek's disease virus (MDV) lacking the Meq oncogene confers protection against challenge with a very virulent plus strain of MDV. *Vaccine* 26:1887-1892. 2008.
23. **LIAN, L., L.J. QU, J.X. ZHENG, C.J. LIU, Y.P. ZHANG, Y.M. CHEN, G.Y. XU, AND N. YANG.** Expression profiles of genes within a subregion of chicken major histocompatibility complex B in spleen after Marek's disease virus infection. *Poult Sci* 89:2123-2129. 2010.
24. **LUPIANI, B., L.F. LEE, X. CUI, I.M. GIMENO, A. ANDERSON, R.W. MORGAN, R.F. SILVA, R.L. WITTER, H.J. KUNG, AND S.M. REDDY.** Marek's disease virus-encoded Meq gene is involved in transformation of lymphocytes but is dispensable for replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11815-11820. 2004.

25. **MAREK, J.** Multiple Nervenentzündung (Polyneuritis) bei Hühnern. Deut.Tierarztl.Woch. 15:417-421. 1907.
26. **MORIMURA, T., K. OHASHI, Y. KON, M. HATTORI, C. SUGIMOTO, AND M. ONUMA.** Apoptosis and CD8-down-regulation in the thymus of chickens infected with Marek's disease virus - Brief report. Arch.Virol. 141:2243-2249. 1996.
27. **MORIMURA, T., K. OHASHI, Y. KON, M. HATTORI, C. SUGIMOTO, AND M. ONUMA.** Apoptosis in peripheral CD4+T cells and thymocytes by Marek's disease virus-infection. Leukemia 11:206-208. 1997.
28. **NAZERIAN, K.** Electron microscopy of a herpesvirus isolated from Marek's disease in duck and chicken embryo fibroblast cultures. Proc.Electron Micro.Soc.America:222-223. 1968.
29. **NEGISHI, H., T. OSAWA, K. OGAMI, X. OUYANG, S. SAKAGUCHI, R. KOSHIBA, H. YANAI, Y. SEKO, H. SHITARA, K. BISHOP, H. YONEKAWA, T. TAMURA, T. KAISHO, C. TAYA, T. TANIGUCHI, AND K. HONDA.** A critical link between Toll-like receptor 3 and type II interferon signaling pathways in antiviral innate immunity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:20446-20451. 2008.
30. **NIKURA, M., T. KIM, H.D. HUNT, J. BURNSIDE, R.W. MORGAN, J.B. DODGSON, AND H.H. CHENG.** Marek's disease virus up-regulates major histocompatibility complex class II cell surface expression in infected cells. Virology 359:212-219. 2007.
31. **PAPPENHEIMER, A.M., L.C. DUNN, AND V. CONE.** A study of fowl paralysis: Neurolymphomatosis gallinarum. Storrs Agr.Exp.Sta. 143:187-290. 1926.
32. **PAPPENHEIMER, A.M., L.C. DUNN, AND V. CONE.** Studies on fowl paralysis (neurolymphomatosis gallinarum). I. Clinical features and pathology. J.Exper.Med. 49:63-86. 1929.
33. **PARVIZI, P., A.I. MALLICK, K. HAQ, H.R. HAGHIGHI, S. OROUJI, N. THANTRIGEDON, M. ST PAUL, J.T. BRISBIN, L.R. READ, S. BEHBOUDI, AND S. SHARIF.** A toll-like receptor 3 ligand enhances protective effects of vaccination against Marek's disease virus and hinders tumor development in chickens. Viral Immunol 25:394-401. 2012.
34. **PAYNE, L.N., AND M. RENNIE.** Pathogenesis of Marek's disease in chicks with and without maternal antibody. J.Natl.Cancer Inst. 51:1559-1573. 1973.
35. **SCHAT, K.A., R.D. SCHULTZ, AND B.W. CALNEK.** Marek's disease: Effect of virus pathogenicity and genetic susceptibility on response of peripheral blood lymphocytes to concanavalin-A. In: Advances Comparative Leukosis Research. P. Bentvelzen, J. Hilgers and D.S. Yohn, eds. Elsevier, Amsterdam. pp 183-186. 1978.
36. **SCHAT, K.A.** Marek's disease immunosuppression. In: Marek's disease an evolving problem. F. Davison, Venugopal, N., ed. Elsevier, Compton. pp 142-155. 2004.
37. **SCHWARZ, H., K. SCHNEIDER, A. OHNEMUS, M. LAVRIC, S. KOTHLOW, S. BAUER, B. KASPERS, AND P. STAEHEL.** Chicken toll-like receptor 3 recognizes its cognate ligand when ectopically expressed in human cells. Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research 27:97-101. 2007.
38. **SHARMA, J.M., L.F. LEE, AND P.S. WAKENELL.** Comparative viral, immunologic and pathologic responses of chickens inoculated with herpesvirus of turkeys as embryos or at hatch. Amer.J.Vet.Res. 45:1619-1623. 1984.
39. **SILVA, R.F., J.R. DUNN, H.H. CHENG, AND M. NIKURA.** A MEQ-deleted Marek's disease virus cloned as a bacterial artificial chromosome is a highly efficacious vaccine. Avian Dis 54:862-869. 2010.
40. **SUN, A.J., XU X.Y., PETHERBRIDGE L., ZHAO Y.G., NAIR V., AND CUI Z.Z..** Functional evaluation of the role of reticuloendotheliosis virus long terminal repeat (LTR) integrated into the genome of a field strain of Marek's disease virus. Virology 397:270-276. 2010.

41. **THANTHRIGE-DON, N., L.R. READ, M.F. ABDUL-CAREEM, H. MOHAMMADI, A.I. MALLICK, AND S. SHARIF.** Marek's disease virus influences the expression of genes associated with IFN-gamma-inducible MHC class II expression. *Viral Immunol* 23:227-232. 2010.
42. **THEIS, G.A., MCBRIDE R.A., AND SCHIERMAN L.W..** Depression of in vitro responsiveness to phytohemagglutinin in spleen cells cultured from chickens with Marek's disease. *J.Immunol.* 115:848-853. 1975.
43. **VENUGOPAL, K., BLAND A.P., ROSS L.J.N., AND PAYNE L.N..** Pathogenicity of an unusual highly virulent Marek's disease virus isolated in the United Kingdom. In: *Current Research on Marek's Disease.* R.F. Silva, H.H. Cheng, P.M. Coussens, L.F. Lee and L.F. Velicer, eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA. pp 119-124. 1996.
44. **WITTER, R.L., LI D., JONES D., LEE L.F., AND KUNG H.J..** Retroviral insertional mutagenesis of a herpesvirus: A Marek's disease virus mutant attenuated for oncogenicity but not for immunosuppression or in vivo replication. *Avian Dis.* 41:407-421. 1997.
45. **WITTER, R.L.** Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Dis.* 41:149-163. 1997.
46. **WITTER, R.L., B.W. CALNEK, C. BUSCAGLIA, I.M. GIMENO, AND K.A. SCHAT.** Classification of Marek's disease viruses according to pathotype: philosophy and methodology. *Avian Pathology* 34:75-90. 2005.