

MAREKOVA BOLEST KOD HOLANDSKE BELOĆUBASTE ŽIVINE* MAREK'S DISEASE IN THE HOLLAND WHITE CRESTED CHICKENS

Spalević Ljiljana, Maslić – Strižak Danka, Kureljušić Branislav, Milićević Vesna,
Radanović Oliver, Jezdimirović Nemanja**

Marekova bolest je virusno limfoproliferativno oboljenje živine koje se karakteriše stvaranjem limfoma u muskulaturi, koži, oku ili unutrašnjim organima. Širenjem virusa iz epitela folikula pera bolest se brže prenosi kroz jato. Živina se zarazi putem prašine i ostaje nosilac virusa tokom čitavog života. Virus se ne prenosi vertikalno. Bolest se može pojaviti u tri oblika: nervni, visceralni i kožni. Obolela živina može imati bilo koji oblik ili kombinaciju navedenih.

Cilj ovog ispitivanja je bio da se ustanovi uzročnik poremećaja zdravstvenog stanja u jatu holandske beloćubaste živine. Jato je imalo 25 jedinki čija se starost kretala od 4-16 nedelja. Zapaženo je da je živina kahektična, da pokazuje znake sporadične dijareje i da su uginule 3 koke i 2 petla. Patoanatomskim pregledom ustanovljene su promene na pojedinim unutrašnjim organima. Jetra je bila uvećana sa limfoidnim proliferatima na površini i u parenhimu, slezina višestruko uvećana i mramorirana a žlezdani želudac dilatiran sa petehijalnim krvarenjima na slusokoži.

Promenjeni organi su podvrgnuti patohistološkom ispitivanju. U jetri su uočene multifokalne limfoidne infiltracije sa posledičnom atrofijom parenhima, u slezini pored limfoblastne proliferacije uočeni su i heterofilni i histiocitni infiltrati, u žlezdanm želucu limfoblastna infiltracija sa kongestijom kapilara i sitnim krvarenjima.

U uzorcima patološki promenjenih organa PCR metodom dokazan je genom virusa Marekove bolesti serotipa GaHv-2. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da je živina obolela od Marekove bolesti koja se ispoljila u visceralnoj formi.

Ključne reči: Marekova bolest, dijagnostika, holandska beloćubasta živina

* Rad primljen za štampu 27.06. 2016.

** Dr sc. vet. med. Spalević Ljiljana, naučni savetnik, Dr sc. vet. med. Maslić – Strižak Danka, naučni savetnik, Dr sc. vet. med. Kureljušić Branislav, naučni savetnik, Dr. sc. vet. med. Milićević Vesna, naučni savetnik, Dr sc. vet. med. Radanović Oliver, naučni savetnik, Dr sc. vet. med. Jezdimirović Nemanja, naučni savetnik, NIVS, Beograd, Srbija

Uvod / Introduction

Marekova bolest (MB) je kontagiozno, limfoproliferativno oboljenje živine. Bolest se može ispoljiti kao hronični polineuritis, limfomi u visceralnim organima i drugim tkivima, prolazna paraliza i moždani edem (Nair, 2005). Uzročnik bolesti je virus koji pripada porodici Herpesviridae, subporodici Alphaherpesvirinae, rodu *Mardivirus* (Islam i sar., 2004). Jedan je od najonkogenijih poznatih herpes virusa. Tri serotipa virusa imaju iste antigenske determinante: Gallid herpesvirus tip 2 (GaHv-2), Gallid herpesvirus tip 3 (GaHv-3) i Meleagrid herpesvirus 1 (MeHv-1) (Couteaudier i Denesvre, 2014). Serotipu GaHv-3 pripadaju nepatogeni sojevi, serotipu GaHv-2 patogeni (onkogeni) i oslabljeni sojevi virusa MB, a MeHv-1 je nepatogen i izolovan iz ćuraka (Nair, 2005). Serotip GaHv-2 pokazuje široke varijacije u patogenosti pa su patotipovi klasifikovani kao: blagi (mVMB), virulentni (vVMB), veoma virulentni (vvVMB) i veoma virulentni + (vv+vVMB) (Witter, 1983, Witter i sar., 1997). Bolest je prvi put opisao 1907. godine Joseph Marek u Mađarskoj gde je kod petlova ustanovio paralizu krila i nogu i pretpostavio da je u pitanju polineuritis, pa je bolest nazvao paraliza živine. Virus je izolovan tek 1967. u Velikoj Britaniji i SAD. Inhalacijom kontaminirane prašine virus dospeva u pluća gde inficira B-limfocite i makrofage, a zatim se transportuje u limfoidne organe: Fabricijusovu burzu, timus i slezinu (Baaten i sar., 2009). Nakon umnožavanja u B-limfocitima infekcija se prenosi na aktivirane T-limfocite, uglavnom na CD3+ i CD4+ ćelije koje su odgovorne za stvaranje limfoma u visceralnim organima, perifernim nervima, koži i mišićima (Couteaudier i Denesvre, 2014). Tokom infekcije virus se prenosi u kožu, naročito u folikule pera, odakle kao infektivan dospeva u spoljašnju sredinu. Virus se širi horizontalno. Infekcija onkogenim virusom MB se može podeliti u četiri faze (Calnek, 1986; Schat, 1987, Calnek, 2001):

- tri do šest dana nakon infekcije nastaje rana citolitička infekcija
- 6-8 dana nakon infekcije nastaje latentna faza
- treća i četvrta faza se sastoje od sekundarne citolitičke infekcije i razvoja tumora
- Četrnaest dana nakon infekcije virus se izlučuje iz epitela folikula pera

U različitim fazama infekcije atakovane su sledeće ćelije: B-limfociti u slezini, timusu i Fabricijusovoj burzi su ciljane ćelije za litičku fazu, a za latentnu uglavnom CD4+ T-limfocita (Shek i sar., 1983) kao i CD8+ (Schat i sar., 1991). Kod infekcije vrlo virulentnim plus sojem (vv+) ne razvijaju se pomenute četiri faze infekcije jer ne dolazi do razvoja latentne faze (Jarosinski i sar., 2002). Marekova bolest je jedno od retkih neoplastičnih oboljenja za koje je kasnih šezdesetih godina razvijena vakcina (Okazaki i sar., 1970). Pre upotrebe vakcine mortalitet se kretao od 10% kod brojlera do 60% kod nosilja (Witter i sar., 2005). Izolacijom ćurećeg herpes virusa (HTV) i proizvodnjom vakcine od ovog soja mortalitet se delimično smanjio, da bi se tek proizvodnjom vakcine od apatogenog kokošijeg soja (CVI988) bolest držala pod kontrolom (Velhner i sar., 2007). Pilići se mogu vakcinisati in ovo 2-3

dana pre izleganja, ili u inkubatoru nakon izleganja. Imunizacija smanjuje mortalitet i razvitak tumora. Virus ostaje infektivan u okruženju i na sobnoj temperaturi do 7 meseci, a 16 nedelja u stajskom đubretu (Couteaudier i Denesvre, 2014). U prirodnim uslovima od Marekove bolesti obolevaju domaće kokoši. Iako je i kod divljih ptica dokazana infekcija virusom, one nisu značajne za pojavu širenja ove bolesti (Calnek i Witter, 1987). Patološke promene i antitela prema virusu nađeni su kod fazana, golubova, pataka, gusaka, kanarinaca, japanske prepelice, sove i labuda (Rusov, 1997). Za bolest je prijemčiva i ukrasna živina, a obzirom da se većina gaji u kohabitaciji sa domaćom živinom, mogućnost za infekciju je veća.

Klinički znaci bolesti se najranije primećuju kod pilića uzrasta 3 nedelje, a najčešće od 12-24 nedelje. Razlikuju se akutni i klasični (hronični) oblik bolesti (Rusov, 1997). Akutni oblik izazivaju visoko onkogeni sojevi virusa. Inkubacija traje 14 dana, a oboleli pilići uginu za nekoliko dana. Uginuće se javlja iznenada, nekad i bez pojave kliničke slike bolesti. Kod obolelih jedinki nastaju limfomi u unutrašnjim organima koji izazivaju nespecifične simptome, a u manjem stepenu dolazi do oštećenja nerava. Klasični oblik bolesti izazivaju umereno i slabo onkogeni sojevi virusa. Inkubacija kod hroničnog oblika traje oko 4 nedelje i uglavnom oboleva živina od 4-12 nedelja starosti, pretežno u ekstenzivnim uslovima gajenja. Mortalitet se kreće oko 10%. Ovaj oblik bolesti se karakteriše promenama na nervima usled čega se javljaju: pareza a kasnije paraliza jednog ili oba ekstremiteta, tortikolis, opuštena krila, retko promene na irisu i paraliza očnih kapaka. Limfomi se javljaju kod 5-10% inficiranih jedinki (Rusov, 1997). Bolest se dijagnostikuje izolacijom virusa ili detekcijom genoma virusa molekularnim metodama, kao i dokazivanjem antigena u folikulima pera. Indirektno, dijagnoza se može postaviti nalazom antitela u serumu. Patohistološkim pregledom ustanovljava se nalaz polimorfnih limfoblastnih infiltrata u promenjenim tkivima. Bolest ima značajan ekonomski uticaj na živinarsku industriju, godišnji globalni gubitak se procenjuje na 1-2 milijarde dolara (Morrow i Fehler, 2004).

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Na zahtev vlasnika koji je prijavio promenu zdravstvenog stanja u jatu holandske beloćubaste živine, izvršena je opservacija i klinički pregled jata. Jato se sastojalo od 25 jedinki čija se starost kretala od 4-16 nedelja. Živina je držana poluintenzivno, preko dana slobodno u dvorištu, a uveče u ograđenom prostoru prilagođenom za ovaj tip živine. Jato nije imalo kontakta sa drugom vrstom živine i nije bilo vakcinisano protiv Marekove bolesti. Uginule jedinke (3 kokice i 2 petla) su podvrgnute patoanatomskom ispitivanju. Promenjeni organi su nakon ekstirpacije bili fiksirani u 10% neutralnom formalinu. Nakon dehidracije u rastućoj koncentraciji alkohola prosvetljavani su u ksilolu i uklopljeni u parafin, a zatim isečeni na isečke debljine 5 μ m. Dobijeni tkivni isečci obojeni su hematoksilin-eozinom što nam je omogućilo posmatranje histopatoloških promena. Molekularno ispitivanje promenjenih organa smo obavili PCR metodom (prema Handberg i sar., 2001).

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Postupak za dijagnozu Marekove bolesti je sproveden kliničkim, patoanatomskim i patohistološkim ispitivanjem i na kraju molekularnom potvrdom genoma virusa uzročnika Marekove bolesti.

Kliničkim pregledom je ustanovljeno da je živina kahektična, jede manju količinu hrane i pokazuje znake sporadične dijareje. Ovakve nespecifične znake bolesti saopštavaju i drugi autori (Spencer, 1984). Klinički znaci bolesti mogu biti različiti u zavisnosti od virulentnosti soja MB, starosti živine i prethodnog zdravstvenog stanja (Baigent i sar., 2006).

Patoanatomskim ispitivanjem su uočene promene na jetri, slezini i žlezdanom želucu. Na jetri su uočene degenerativne i nekrotične lezije veličine 2-5mm.

Jetra je bila uvećana sa belim, slaninastim proliferatima na površini (Prilog: slika 1). Žlezdani želudac je bio dilatiran, zadebljanih zidova, sa mestimčnim petehijalnim krvarenjima (slika 2). Slezina je bila višestruko povećana i mramorisana (slika 3).

Nađene patoanatomske promene u visceralnim organima su tipične za Marekovu bolest, što su i opisali pojedini autori (Witter i Schat, 2003).

Za dijagnostiku Marekove bolesti patohistološko ispitivanje ima važnu ulogu. Prisustvo specifičnih inkluzija ili neoplastičnih lezija doprinosi brznoj dijagnostici i sužava dalju diferencijalnu dijagnozu (Dolka i sar., 2012).

Patohistološkim ispitivanjem je ustanovljeno da je zid žlezdanog želuca zadebljao usled limfoblastne infiltracije, a u sluznici se zapaža kongestija kapilara sa sitnim krvarenjima i znaci žlezdane cistične dilatacije (slika 4).

U jetri se uočavaju brojne multifokalne limfoidne infiltracije sa nekrotičnim poljima što je praćeno atrofijom parenhima. U hepatocitima je prisutna masna degeneracija (slika 5). Drugi autori saopštavaju slične patohistološke promene (Pejović i sar., 2007.; Supartika i sar., 2006; Singh i sar., 1996). Patohistološkim ispitivanjem slezine nađena je blago proširena bela pulpa usled limfoblastne infiltracije, a zapaža se i prisustvo heterofilnog i histiocitnog infiltrata sa koagulacionom nekrozom (slika 6). Carvalo i sar., (2011) nalaze još i velike intranuklearne inkluzije, što u našem slučaju nije potvrđeno.

Zaključak / Conclusion

Prema zahtevima OIE-a dijagnoza Marekove bolesti se uspostavlja na osnovu više činilaca (OIE Terrestrial Manual 2016, Chapter 2.3.13.)

Tako se navodi da se dijagnoza donosi na osnovu kliničke slike i mikroskopskih lezija, što je u ovom ispitivanju poslužilo kao polazna tačka uz činjenicu da jato nije bilo vakcinisano. Dijagnostika je nastavljena patoanatomskim i patohistološkim ispitivanjem prisutnih lezija. Prisutne heterogene populacije limfoidnih ćelija u limfomima su bile važan činilac za razlikovanje od limfatične leukoze kod koje se limfomatozne infiltracije sastoje od ujednačenih limfoblasta

(OIE, 2016). Identifikacijom genoma virusa PCR tehnikom potvrđeno je prisustvo virusa Marekove bolesti serotipa GaHv-2 kod ispitivanog jata živine. Ustanovljeno je da se Marekova bolest javila u visceralnoj formi.

Kod obolelog jata sprovedene su veterinarsko-sanitarne mere: izdubavanje, čišćenje i dezinfekcija prostora i neškodljivo uklanjanje obolelih. Kao meru preveniranja bolesti neophodno je izvršiti vakcinaciju pilića nakon izleganja u inkubatoru dok još nisu došli u kontakt sa virusom.

Literatura / References

1. Baaten BJ, Staines KA, Smith LP, Skinner H, Davison TF, Butter C. Early replication in pulmonary B cells after infection with Marek's disease herpesvirus by the respiratory route. *Viral Immunol.* 2009; 22: 431-444.
2. Baigent J Suzan, Smith P Lorraine, Nair K Venugopal, Currie JW Richard. Vaccinal control of Marek's disease: Current challenges, and future strategies to maximize protection. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 2006; 112 (1-2), 78-86
3. Calnek BW. Marek's disease: a model for herpesvirus oncology. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 1986; 12, 293-320.
4. Calnek BW, Witter RL. Marek's disease: Diseases of Poultry (MS Hofstad, BW Calnek, CF Helmboldt, WM Reid, HW Yoder. Iowa State University Press. 1987: 385-418.
5. Calnek BW. Pathogenesis of Marek's disease virus infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2001; 255, 25-55.
6. Carvalho FR, French RA, Gilbert-Marcheterre K, Risatti G, Dunn JR, Forster F, Kiupel M, Smyth JA. Mortality of One-Week-Old Chickens During Naturally Occurring Marek's Disease Virus Infection. *Veterinary Pathology* 2011 ; 48(5) 993-998
7. Couteaudier Mathilde, Denesvre Caroline. Marek's disease virus and skin interactions. *Veterinary Research* 2014; 45 (1) :36
8. Dolka IR, Sapieryński W, Bielecki E, Malicka A, Żbikowski P, Szeleszczuk. Histopathology in diagnosis of broiler chicken and layer diseases - review of cases 1999-2010. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 2012; Vol. 15, No. 4 , 773-779
9. Handberg J Kurt, Nielsen L Ole, Jorgensen H Poul. The use of serotype 1-and serotype 3- specific polymerase chain reaction for the detection of Marek's disease virus in chickens. *Avian Pathology* 2001; 30, 243-249
10. Islam Aminul, Bruce Harrison, Brain F. Cheetham, Timothy J. Mahony, Peter L. Young, Stephen W. Walkden-Brown. Differential amplification and quantitation of Marek's disease viruses using real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virol. Meth.* 2004; Volume 119, Issue 2, 103-113
11. Jarosinski W, Yunis R.W, O'Connell PH., Markowski-Grimsrud CJ, Schat KA. Influence of genetic resistance of the chicken and virulence of Marek's disease virus (MDV) on nitric oxide responses after MDV infection. *Avian Dis.* 2002 ; 46, 636-649
12. Morrow C, Fehler F. Marek's disease: a worldwide problem. Marek's disease: an evolving problem. Edited by: Davison F, Nair V. 2004, London: Elsevier Academic Press, 49-61.
13. Nair V. Evolution of Marek's disease -A paradigm for incessant race between the pathogen and the host. *Vet. J.* 2005; 170, 175-183.
14. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2016 (Marek's disease Chapter 2.3.13.)
15. Okazaki W, Purchase HG, Burmester BR. Protection against Marek's disease by vaccination with a herpesvirus of turkeys. *Avian Diseases* 1970 ;14: 413-429

16. Pejović N, Velhner Maja, Polaček V, Aleksić-Kovačević Sanja, Marinković D, Knežević Milijana. Morphological and immunohistochemical examination of tumor cells in Marek's disease. *Acta Veterinaria* 2007; 57(1) 27-35
17. Rusov Čedomir. Marekova bolest. izd. Jugoslovensko naučno udruženje živinara, Beograd, 1997
18. Schat KA. Marek's disease: a model for protection against herpesvirus-induced tumours. *Cancer Surv.* 1987; 6: 1-37
19. Schat KA, Chen C-LH, Calnek BW, Char D. Transformation of T-lymphocyte subsets by Marek's disease herpesvirus. *J. Virol.* 1991; 65: 1408–1413.
20. Shek WR, Calnek BW, Schat KA, Chen C-LH. Characterization of Marek's disease virus infected lymphocytes: discrimination between cytotytically and latently infected cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 1983; 70: 485-491.
21. Singh A, Oberoi MS, Jand SK, Singh B. Epidemiology of inclusion body hepatitis in poultry in northern India from 1990 to 1994. *Rev Sci Tech* 1996; 15: 1053-1060
22. Spencer L. Progress towards eradication of lymphoid leukosis viruses, A review, *Avian Pathol.* 1984; 13:599-619.
23. Supartika IK, Toussaint MJ, Gruys E. Avian hepatic granuloma. A review. *Vet Q* 2006; 28: 82-89.
24. Velhner Maja, Potkonjak Dubravka, M. Kapetanov, D. Orlić. Pojava Marekove bolesti kod brojlera ustanovljene na liniji klanja. *Živinarstvo* 2007; 5
25. Witter RL, Schat KA. Marek's disease, In: Saif YM editor in chief, *Disease of Poultry 11th Edition*, Blackwell Publishing Co, Iowa State Press, 2003: 407-65.
26. Witter RL, Calnek BW, Buscaglia C, Gimeno I M, Schat, K. A. Classification of Marek's disease viruses according to pathotype: philosophy and methodology. *Avian pathology* 2005; 34: 75-90.
27. Witter RL. Characteristics of Marek's disease viruses isolated from vaccinated commercial chicken flocks: association of viral pathotype with lymphoma frequency. *Avian Diseases* 1983; 27: 113 –132.
28. Witter RL, Li D, Jones D, Lee LF, Kung HJ. Retroviral insertional mutagenesis of a herpesvirus: a Marek's disease virus mutant attenuated for oncogenicity but not for immunosuppression or in vivo replication. *Avian Diseases* 1997; 41: 407 –421.

ENGLISH

MAREK'S DISEASE IN THE HOLLAND WHITE CRESTED CHICKENS

Spalević Ljiljana, Maslić – Strižak Danka, Kureljušić Branislav, Milićević Vesna, Radanović Oliver, Jezdimirović Nemanja

Marek's disease is a viral lymphoproliferative disease of poultry characterized by the creation of lymphoma in muscle, skin, eye or internal organs. Virus maturing into infective forms in follicular epithelium from where enters in the external environment where long time remains infectious. Poultry are infected by dust and remains the holder of the virus throughout their lives. The virus is transmitted vertically. The disease can occur in three forms: nervous, visceral and skin. Affected poultry may have any shape or combination of these.

The aim of this study was to determine the cause of the disorder the health status in the flock of holland white crested chickens. Flock had 25 chickens whose ages ranged from 4-16 weeks. Observation, we noticed that the chickens are cachectic, showing signs of sporadic diarrhea and died 3 hens and 2 roosters. Pathoanatomical examination is ascertained changes in certain internal organs. The liver was enlarged with lymphoid proliferate on the surface and in the parenchyma, spleen increased several times and marbled, glandular stomach (proventriculus) dilated with petechial hemorrhages on

mucose.

Changed organs was examination histopathological. In the liver were observed multifocal lymphoid infiltration with subsequent atrophy of the parenchyma, in addition to spleen lymphoid proliferation heterophyllus and histiocytic infiltrates, in proventriculus lymphoblastic infiltration with congestion of capillaries and small haemorrhages.

In samples pathologically altered organs PCR method proved the genome of Marek's disease virus serotype 1 .

Based on these results we concluded that the livestock were sick from Marek's disease, which is expressed in visceral form.

Key words: Marek's disease, diagnostics, holland white crested chicken

РУССКИЙ

БОЛЕЗНЬ МАРЕКА У КУР ГОЛЛАНДСКОЙ БЕЛОХОХЛОЙ ПОРОДЫ

Спалевич Лиляна, Маслич-Стрижак Данка, Курелюшич Бранислав, Миличевич Весна, Раданович Оливер, Ездимирович Неманя

Болезнь Марека – вирусное лимфопролиферативное заболевание домашней птицы, характеризующееся образованием лимфом в мускулатуре, на коже, в глазу или внутренних органах. При распространении вируса из эпителия перьевого фолликула заболевание быстро распространяется в стаде. Заражение птицы происходит через пыль, птица пожизненно остается вирусоносителем. Вирус имеет вертикальный путь передачи. Болезнь протекает в трех формах: невральная, висцеральная и кожная. У больной птицы может наблюдаться любая из этих форм или их комбинация.

Целью данного исследования является определение причины нарушения состояния здоровья стада кур голландской белохохлой породы. Стадо образуют 25 особей, возраст которых составляет 4-16 недель. У птицы отмечалась кахектичность, присутствовали симптомы спорадической диареи, зафиксирована гибель 3 несушек и 2 петухов. По результатам патологоанатомической диагностики установлены изменения отдельных внутренних органов. Печень увеличена, присутствуют лимфоидная пролиферация на поверхности и в паренхиме, селезенка многократно увеличена и имеет мраморную окраску, железистый желудок дилатирован петехиальными кровоизлияниями на слизистой оболочке.

Измененные органы были подвергнуты гистопатологическому исследованию. В печени обнаружены мультифокальные лимфоидные инфильтраты с последующей атрофией паренхимы, в селезенке кроме лимфобластной пролиферации обнаружены гетерофильные и гистиоцитарные инфильтраты, в железистом желудке лимфобластная инфильтрация с конгестией капилляров и мелкими кровоизлияниями.

В образцах патологически измененных органов методом ПЦР был подтвержден геном вируса болезни Марека серотипа GaHv-2.

На основании полученных результатов сделано заключение, свидетельствующее о заболевании птицы висцеральной формой болезни Марека.

Ключевые слова: болезнь Марека, диагностика, голландская белохохлая порода кур