

# Przypadek zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy w stadzie kurek ozdobnych

EWA KARPIŃSKA, ARTUR ŻBIKOWSKI, PIOTR SZELESZCZUK,  
GRAŻYNA KOSOWSKA, **ELŻBIETA MALICKA\***

Zakład Chorób Ptaków i Zakład Patomorfologii Zwierząt\*, Katedra Nauk Klinicznych  
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Karpińska E., Żbikowski A., Szeleszczuk P., Kosowska G., **Malicka E.**

**Infectious laryngotracheitis in a Crested Polish flock – case report**

## Summary

Infectious laryngotracheitis (ILT) is a disease that causes high death losses in susceptible poultry. In autumn 2007, a number of live and dead chickens from a Crested Polish breeding of 150 birds were submitted to the Institute of Poultry Diseases. Clinically, the affected birds showed severe symptoms of respiratory system irritation (gasping, difficulties in breathing, wheezing), whereas at necropsy, haemorrhagic inflammation of the mucosa of the larynx and of the upper part of the trachea was noted. Pathologically changed segments of the respiratory system and swabs from the buccal cavity were taken for laboratory examination. Histopathological examination of cell nuclei in the affected respiratory tract revealed Seifried intranuclear inclusion bodies that are characteristic of ILT. Virological examination of the chorionic-allantoic membrane in 11-day chicken embryos showed changes typical for ILT virus replication in the first passage. The presence of viral DNA was detected by the PCR method in all samples from swabs, chorionic-allantoic membrane, and segments of the trachea. The disease outbreak was caused by the introduction of vaccinated birds into a non-vaccinated flock.

**Keywords:** ILT, Crested Polish, histopathology, PCR

Zakaźne zapalenie krtani i tchawicy (Infectious Laryngotracheitis – ILT) jest chorobą, która może powodować ogromne straty w chowie kur, bażantów, perlic i pawi (4). Systematyczne szczepienie ptaków w fermach, gdzie wirus występuje stacjonarnie, przyczynia się do zmniejszenia ryzyka wystąpienia choroby w produkcji wielkotowarowej. Pozostaje jednak niebezpieczeństwo przeniesienia się wirusa do mniejszych hodowli drobiu ozdobnego czy przyzagrodowego, które na ogół nie są objęte programami immunoprofilaktyki (2, 5).

Istotnym problemem epidemiologicznym, przyczyniającym się do rozprzestrzeniania wirusa ILT w środowisku, jest zjawisko latencji. Materiał genetyczny wirusa ILT wbudowany do genomu komórek gospodarza, może przetrwać w organizmie ptaka wiele miesięcy zarówno po zakażeniu, jak również po szczepieniu. Miejscem przetrwania dla wirusa ILT są komórki zwoju nerwu trójdzielnego (8). Pod wpływem stresu (transport ptaków, początek nieśności, pogorszenie warunków środowiskowych) dochodzi do replikacji i siewstwa kompletnych cząstek wirusa (3). Badania wykonane w ostatnich latach potwierdzają narastanie zagrożenia ILT w intensywnej produkcji drobiarskiej

(7). Dotychczas w kraju nie opisano przypadków ILT w hodowlach kur ozdobnych.

## Opis przypadku

Jesienią 2007 r. do Zakładu Chorób Ptaków dostarczono kurki ozdobne – czubatki polskie o czarnym ubarwieniu. Jak ustalono w trakcie wywiadu, ptaki w wieku 7 miesięcy zachorowały z silnymi objawami zaburzeń ze strony układu oddechowego. Poza ptakami żywymi (5 sztuk) z charakterystycznymi objawami klinicznymi dostarczono do badań również ptaki padłe (6 sztuk). Właściciel stadka liczącego około 150 kurek trzy miesiące wcześniej zakupił za granicą i włączył do hodowli trzy cenne egzemplarze. Po kilkunastu dniach od wprowadzenia nowo zakupionych ptaków u ptaków miejscowych pojawiły się pierwsze objawy chorobowe ze strony układu oddechowego. Zachorowała ponad połowa ptaków i odnotowano również upadki. W wywiadzie ustalono, że nowo wprowadzone ptaki były wcześniej szczepione przeciwko zakaźnemu zapaleniu krtani i tchawicy, natomiast stada, do którego zostały włączone, nie poddano szczepieniu.

W Ambulatorium Zakładu Chorób Ptaków ptaki z objawami klinicznymi poddano eutanazji. Podczas sekcji pobrano wycinki wątrób i płuc do badań bakteriologicznych, a wycinki krtani, tchawicy, oskrzeli oraz płuc – do badań

mikroskopowych. Materiał utrwalono w 10% zbuforowanej formalinie, zatopiono w parafinie, a skrawki mikrotomowe barwiono hematoksyliną i eozyną (H-E).

Do badań wirusologicznych pobrano wycinki chorobowo zmienionej krtani oraz tchawicy. Rutynowo przygotowanym supernatantem zakażono 11-dniowe zarodki kurcze na błonę kosmówkowo-omocznioową. Wykonano tylko jeden pasaż badanego materiału.

Próbki do izolacji wirusowego DNA stanowiły wymazy z tchawicy, wycinki tchawic oraz fragmenty zmienionych błon kosmówkowo-omocznioowych.

Izolację wirusowego DNA przeprowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu Sherlock AX (A&A Biotechnology, Polska), zgodnie z procedurą podaną przez producenta. Reakcję PCR przeprowadzono przez amplifikację fragmentu genu p32 wirusa ILT w badanym materiale (3), wykorzystując pary specyficznych starterów o następujących sekwencjach: ILTp32-U2: 5'-CTA CGT GCT GGG CTC TAA TCC-3' i ILTp32-L2 5'-AAA CTC TCG GGT GGC TAC TGC -3'. Skład mieszaniny reakcyjnej został dobrany eksperymentalnie, natomiast profil temperatury był zgodny z danymi piśmiennictwa (6). Mieszanina reakcyjna zawierała: 5,0 µl buforu dla polimerazy Taq 10 X (100 mM Tris HCl pH = 8,8, 500 mM KCl) (MBI Fermentas, Litwa), 5,0 µl dNTPs Mix (MBI Fermentas, Litwa), 4,0 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM; MBI Fermentas, Litwa), 25 pmoli każdego ze starterów (IBB PAN, Polska), 5 µl matrycowego DNA genomowego, 1 U Taq DNA polimerazy (MBI Fermentas, Litwa), wodę demineralizowaną (Polpharma S.A., Polska) do końcowej objętości 50 µl.

Proces amplifikacji obejmował kolejne etapy: wstępną denaturację w temperaturze 95°C w ciągu 5 minut, a następnie 35 cykli, przebiegających w następujących warunkach: denaturacja w temperaturze 95°C w czasie 30 s; przyłączanie starterów – 55°C, 30 s; wydłużanie łańcucha – 72°C, 30 s. Końcowe wydłużanie przebiegało w temperaturze 72°C przez 5 minut (6).

Produkty amplifikacji analizowano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym (Serva, Niemcy) z dodatkiem 0,5 µg/ml bromku etydyny, w 1% buforze TAE, przy stałym napięciu 100 V w czasie 90 minut, a produkt elektroforezy fotografowano w świetle UV przy użyciu programu Quantity One (VersaDoc; Bio-Rad, USA). Poszukiwano fragmentu o długości 588 par zasad (6). Jako wzorzec wielkości fragmentów DNA stosowano marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Litwa).

## Wyniki i omówienie

Zmiany anatomopatologiczne padłych i poddanych eutanazji chorych ptaków ograniczały się do błony śluzowej szpary podniebiennej, małżowin nosowych, krtani oraz tchawicy i były typowe dla ILT (ryc. 1). W preparatach mikroskopowych wykonanych z pobranych wycinków krtani, tchawicy, oskrzeli i płuc stwierdzono poza różnego stopnia rozlanymi naciekami komórek zapalnych, przekrwieniem i ogniskową martwicą komórek nabłonka także ciała wtrętowe Seifrieda w jądrach złuszczonej komórek nabłonka (ryc. 2) (1). Ponadto wykazano obecność DNA wirusowego (produkt o wielkości 588 bp) we wszystkich próbkach po-

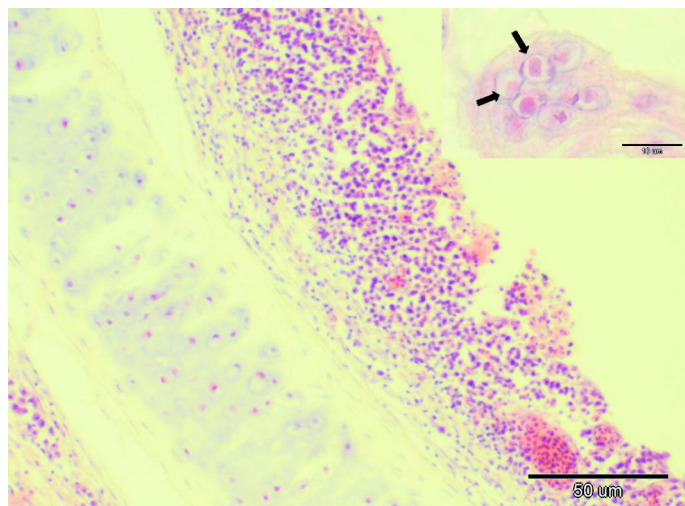
chodzących zarówno z wymazów, jak i wycinków tchawicy, co świadczy, że był on czynnikiem etiologicznym zachorowań w badanym stadzie kurek ozdobnych (ryc. 3).

W badaniu wirusologicznym, przeprowadzonym na zarodkach kurzych, pierwsze zamarcia zarodków nastąpiły już w 3. dniu po zakażeniu. W ciągu 7 dni zamarły wszystkie zarodki inokulowane badanym materiałem. Nie zakażone zarodki kontrolne – nie zamierały. U wszystkich zamartwych zarodków stwierdzono zmiany, charakterystyczne dla replikacji wirusa ILT (ryc. 4). Obecność wirusa ILT w wycinkach zmienionych błon kosmówkowo-omocznioowych potwierdzono izolując wirusowe DNA.

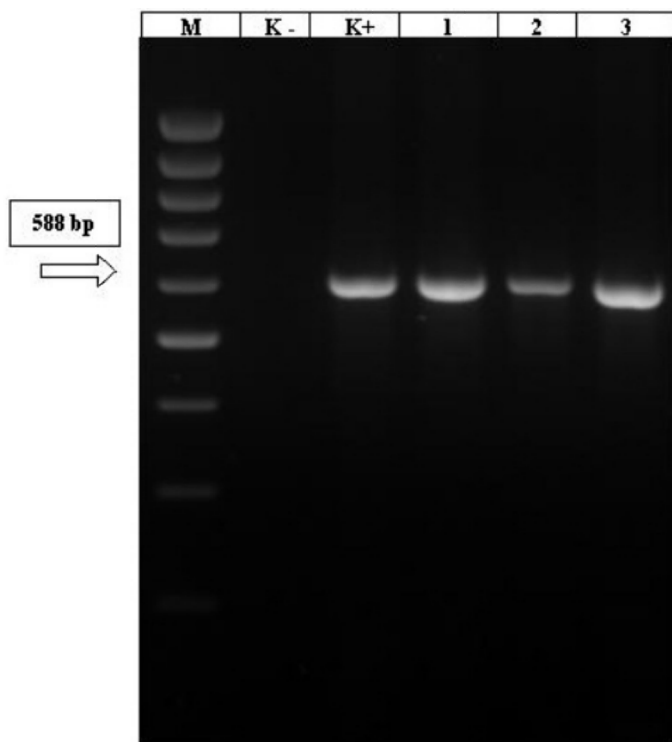
Reasumując – na podstawie objawów klinicznych, zmian anatomopatologicznych oraz kompleksowych badań obejmujących diagnostykę histopatologiczną, molekularną (PCR) oraz wirusologiczną stwierdzono, że przyczyną choroby w stadzie kurek ozdobnych był wirus ILT. Zachorowania były spowodowane wprowa-



Ryc. 1. Krwotoczne zapalenie błony śluzowej krtani i górnej części tchawicy



Ryc. 2. Ogniskowa martwica komórek nabłonka oraz wewnątrzjądrowe ciała wtrętowe Seifrieda w złuszczonej komórkach nabłonka

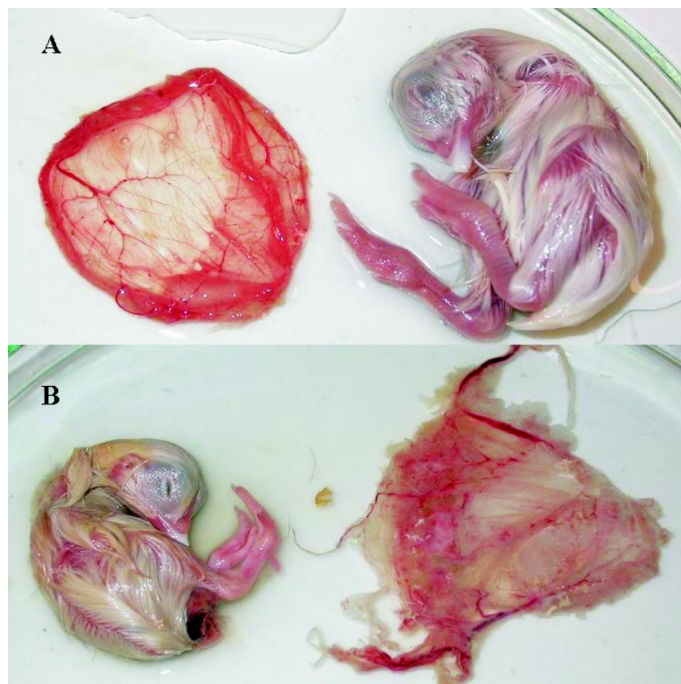


Ryc. 3. Wynik badania techniką PCR obecności DNA wirusa ILT w badanym materiale: M – marker (GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus); K- – kontrola ujemna, K+ – kontrola dodatnia (szczep Serva ILTV, Intervet); 1 – fragmenty zmienionych błon kosmówkowo-omocznionych; 2 – wymazy z tchawicy; 3 – wycinki tchawic

dzeniem ptaków szczepionych do stada ptaków nie szczepionych przeciwko tej chorobie.

### Piśmiennictwo

1. Cąkała A., Roszkowski J.: Ocena metod barwienia ciałek wtrętowych przy zakaźnym zapaleniu krtani i tchawicy u kur. *Medycyna Wet.* 1968, 24, 407-409.
2. Dufour-Zavala L.: Epizootiology of infectious laryngotracheitis and presentation of an industry control program. *Avian Dis.* 2008, 52, 1-7.
3. Fuchs W., Veits J., Helferich D., Granzow H., Teifke J. P., Mettenleiter T. C.: Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. *Vet. Res.* 2007, 38, 261-279.



Ryc. 4. Błona kosmówkowo-omoczniona i zarodek z grupy kontrolnej (A) i badanej (B)

4. Kaleta E. F., Redmann T.: Infectious laryngotracheitis in chickens, peacocks and pheasants and means and limitations for its control with attenuated live vaccines. *Tierärztl. Prax.* 1997, 25, 605-610.
5. Rodriguez-Avila A., Oldoni I., Riblet S., Garcia M.: Evaluation of the protection elicited by direct and indirect exposure to live attenuated infectious laryngotracheitis virus vaccines against a recent challenge strain from the United States. *Avian Pathol.* 2008, 37, 287-292.
6. Vöggtlin A., Bruckner L., Ottiger H.: Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of vaccine contamination by infectious laryngotracheitis virus. *Vaccine* 1999, 17, 2501-2506.
7. Wieliczko A., Mazurkiewicz M., Piasecki T., Kuszczynski T.: The clinical course of the Infectious Laryngotracheitis (ILT) field case in hens and estimation of immunoprophylaxis efficiency. *Pol. J. Vet. Sci.* 2004, 7, 143-147.
8. Williams R. A., Bennett M., Bradbury J. M., Gaskell R. M., Jones R. C., Jordan F. T. W.: Demonstration of sites of latency of infectious laryngotracheitis virus using the polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* 1992, 73, 2415-2420.

Adres autora: dr Ewa Karpińska, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa;  
e-mail: Ewa\_Karpin@poczta.onet.pl