

# Pierwszy przypadek syndromu Alabama Red Leg u brojlerów w Polsce

PIOTR SZELESZCZUK, ELŻBIETA SAMOREK-SALAMONOWICZ\*, WOJCIECH KOZDRUŃ\*,  
KATARZYNA KRÓL\*, ELŻBIETA MALICKA, EWA KARPIŃSKA

Katedra Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa  
\*Pracownia Diagnostyki Chorób Wirusowych Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego  
– Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Szeleszczuk P., Samorek- Salamonowicz E., Kozdruń W., Król K., Malicka E., Karpińska E.  
**First case of Alabama Red Leg Syndrome in broiler chickens in Poland**

## Summary

The aim of the study was to determine the causative agent of Alabama Red Leg syndrome – so far not observed in broiler chickens in Poland. Clinical examinations of Ross 308 broiler chickens demonstrated changes in the form of hemorrhagic and swelling of skin in the shank region. During anatomopathological examinations multiple proliferate changes in skin and visceral organs were ascertained. Characteristic changes for Marek's disease virus in visceral organs were observed during histopathology examinations. The presence of the DNA of Marek's disease virus was demonstrated in liver cells and feather follicles by PCR. Virological examinations isolated Marek's disease virus in chicken embryo fibroblast cultures (CEF). On the basis of clinical signs and anatomopathological changes as well as complex examinations including histopathology, molecular (PCR) and virological diagnosis, it was ascertained that the virulent Marek's disease virus strain (v MDV) was the causative agent of Alabama Red Leg syndrome in broiler chickens.

**Keywords:** Alabama Red Leg, Marek's disease virus

Choroba Mareka jest nowotworową chorobą drobiu, wywoływaną przez wirus z podrodziny *Alphaherpesvirinae*, rodziny *Herpesviridae*. W jej przebiegu wyróżnia się następujące postacie kliniczne: postać nadostrą, postać ostrą, postać klasyczną oraz paraliż przejściowy (transient paralysis). Przyjęty jest też inny podział na formę nerwową oraz formę narządową, nazywaną postacią nowotworową. U brojlerów najczęściej spotyka się formę skórą (4).

W 2004 r. opisano w stanie Alabama (USA) u brojlerów zmiany lokalizujące wzdłuż przebiegu naczyń krwionośnych skoku (kości stępowo-śródstopowej). Z powodu charakterystycznego czerwonego zabarwienia skóry nóg przypadkom tym nadano opisową nazwę Alabamska czerwona noga – Alabama Red Leg. Przyjmuje się, że wirus choroby Mareka jest czynnikiem etiologicznym tego syndromu (5). W Polsce dotychczas nie stwierdzano występowania u kurcząt zespołu Alabama Red Leg.

Celem badań było określenie czynnika etiologicznego tego syndromu.

## Materiał i metody

Do badania dostarczono 6 padłych i 21 żywych, chorych kurcząt brojlerów linii użytkowej Ross 308 w wieku 7 tygodni. Ptaki pochodziły ze stada liczącego 26 000 kurcząt. Kurnik, w którym przebywały ptaki znajdował się w od-

ległości 60 m od ubojni drobiu. W programie immunoprofilaktyki, realizowanym w tym stadzie, stosowano jedynie szczepienia przeciwko chorobie Gumboro.

Ptaki padłe oraz żywe po uprzednim wykrwawieniu poddano badaniu anatomopatologicznemu. Na sekcji pobierano końcówki piór i wycinki: wątroby, śledziony, bursy Fabricjusza, nerek, żołądka gruczołowego, płuc, kości stępowo-śródstopowej oraz fragmenty makroskopowo zmienionej skóry.

Pobrane wycinki utrwalano w 8% zbuforowanej formalinie, a następnie sporządzano z nich skrawki parafinowe, które barwiono eozyną i hematoksyliną.

### Łańcuchowa reakcja polimerazowa.

**Izolacja całkowitego, komórkowego DNA.** Z pobranych wycinków wątroby i śledziony sporządzano homogenizaty, a końcówki piór ucinano tak, aby uzyskać fragmenty o długości 5 mm. Proces izolacji DNA przeprowadzono przy użyciu zestawu komercyjnego firmy A&A Biotechnology. 500 µl każdego z homogenizatów i końcówki piór zawieszano w mieszaninie buforu TE (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8,0), buforu LT (mieszanina fenolu, chloroformu i alkoholu izoamylowego w stosunku 1 : 1 : 24) i roztworu proteiny K (20 mg proteiny K w 1 ml wody destylowanej) w stosunku 500 µl homogenizatu, 100 µl buforu TE, 200 µl buforu LT i 20 µl roztworu proteiny K. Otrzymaną zawiesinę inkubowano w temperaturze 37°C do momentu uzyskania klarownego roztworu. Po intensywnym wytrząsaniu przez 20 sek. i inkubacji przez 5 min. w tem-

peraturze 75°C, próbki wirowano przez 3 min. przy 500 × g. Supernatant w ilości 300 µl наносono na kolumnę rozdzielczą ze złożem krzemionkowym umieszczoną w próbówce Eppendorfa i wirowano przez 1 min. przy 500 × g. Następnie dodawano 500 µl roztworu A1 (96% etanol z 5 M NaCl) i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Kolumnę przenoszono do nowej próbówki i dodawano 300 µl roztworu A1. Po kolejnym wirowaniu przy zachowaniu tych samych parametrów dodawano 200 µl buforu TE ogrzanego uprzednio do temperatury 75°C. Złoże inkubowano 5 min. w temperaturze pokojowej. Po odwirowaniu przez 30 sek. przy 500 × g zbierano bufor TE zawierający DNA. Następnie DNA pochodzące z komórek wątroby od dwóch ptaków zlewano razem i traktowano jako jedną próbkę. Tak samo postępowano z DNA pochodzącym z komórek śledziony i końcówek piór. Łącznie otrzymano 3 próbki DNA z komórek wątroby, 3 próbki DNA z komórek śledziony i 3 próbki DNA z komórek końcówek piór, pochodzące od 6 ptaków. DNA przechowywano do dalszych badań w temperaturze -20°C.

**Oligonukleotydy (startery).** Do amplifikacji zastosowano pary starterów charakterystyczne dla sekwencji 132 bp i fragmentu genomu kodującego białko meq wirusa choroby Mareka. Sekwencje nukleotydowe starterów były następujące: M1321 5' TAC TTC TAT ATA GAT TGA GAC GT 3' i M1322 5' GAG ATC CTC GTA AGG TGT AAT ATA 3' dla sekwencji 132 bp. MEQ1 5' GCA CTC TAG AGG TGT AAA GAG ATG TCT CAG 3' i MEQ2 5' TAA CTC GAG AAG AAA CAT GGG GCA TAG 3' dla genu meq. Startery te zostały zsyntetyzowane w IBB w Warszawie.

**Amplifikacja DNA.** Mieszanina PCR o objętości 50 µl zawierała: 5 µl buforu PCR, 2 µl mieszaniny deoksynukleotydów (0,2 mM), 2 µl 5 mM MgCl<sub>2</sub>, po 2 µl starterów, 4 µl wyizolowanego DNA, 1 µl polimerazy DNA oraz 32 µl wody dejonizowanej. Profil termiczny reakcji był następujący: 96°C – 2 min. (denaturacja wstępna); 94°C – 1 min. (denaturacja właściwa); 52°C – 1 min. w przypadku starterów charakterystycznych dla sekwencji 132 bp, 62,5°C – 1 min. dla starterów specyficznych dla genu meq (przyłączenie starterów); 72°C – 1 min. (wydłużanie łańcucha); 72°C – 10 min. (końcowe wydłużanie łańcucha).

**Analiza produktów PCR.** Analizowano je po przeprowadzeniu rozdzielania elektroforetycznego w 2% żelu agarozowym. Do baseników наносono po 5 µl mieszaniny po reakcyjnej i 2 µl buforu obciążającego do prób (0,25% błękit bromofenolowy; 40% (w/v) sacharoza w wodzie). Jako buforu elektrodowego używano buforu TBE (TRIS Base – 10,8 g; kwas borowy – 5,5 g; 4 ml 0,5M; EDTA o pH 8,0). Wzorec masowy stanowił DNA plazmidu pUC19 trawionego enzymami restrykcyjnymi HaeIII i TaqI (DNA Gdańsk). Rozdział elektroforetyczny przeprowadzano przez 1 h przy napięciu 10 V/cm długości żelu. Po zakończonej elektroforezie żel płukano w roztworze bromku etydyny (1 µg/ml), a następnie porównywano wielkość zamplifikowanych fragmentów z wzorcem masowym DNA.

**Hodowla fibroblastów zarodka kurzego (CEF).** Sporządzano ją z 9-11-dniowych zarodków kurzych SPF wg ogólnie przyjętych zasad. Wyjściowa koncentracja komórek wynosiła 0,8 × 10<sup>6</sup> w ml. Po uzyskaniu jednolitej war-

stwy komórek zakażano je homogenizatami z wątroby i ze śledziony. Zakażone hodowle inkubowano przez 10 dni w temperaturze 37,5°C i wilgotności 85%, codziennie kontrolując pod mikroskopem. Wykonano 0-5 pasażów badanego materiału wirusowego.

## Wyniki i omówienie

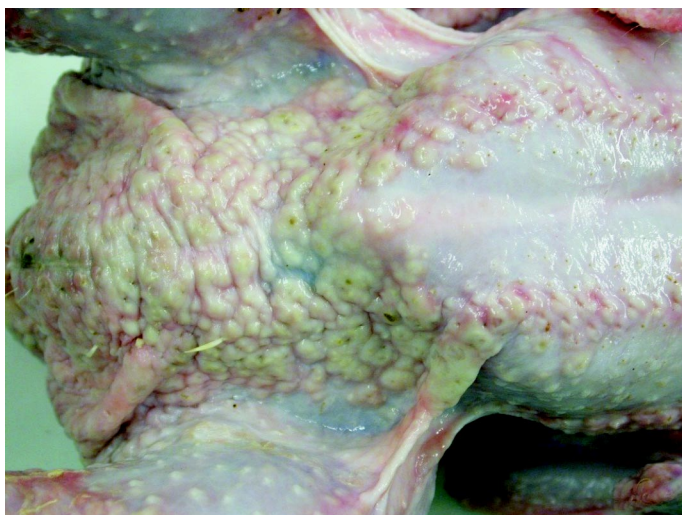
Choroba Mareka u brojlerów występuje najczęściej w postaci skórnej, pomiędzy 4. a 5. tygodniem życia. Po usunięciu upierzenia skóra przypomina tzw. gęsią skórę. Obserwuje się znacznego stopnia przekrwienia oraz zgrubienia, a brodawki piór zmienione są nowotworowo. Nie stwierdza się ponadnormatywnych padnięć ptaków w stadzie. Jednakże z powodu nieestetycznego wyglądu tuszki, w ubojni może dochodzić nawet do 90% wybrakowań. Taka postać choroby Mareka u brojlerów często nazywana jest białaczką skóry (skin leucosis).

W badanym stadzie kurcząt brojlerów ponadnormatywne padnięcia i znaczne różnicowanie się stada zaobserwowano od 16. dnia odchowu. Wystąpiły również objawy niezborności ruchowej. Szczegółowe oględziny chorych ptaków wykazały u części z nich zmiany zlokalizowane na skórze, w miejscach opierzonych i miejscach pozbawionych piór. Skóra w okolicy szyi, mostka i brzucha pokryta była tzw. gęsią skórą, pęcherzami, niekiedy krostami lub strupami (ryc. 1). U części ptaków okolica skoku i palców była zaczerwieniona i zgrubiała, a na przebiegu tętnic i żył śródstopia widoczne były charakterystyczne zmiany rozrostowe (ryc. 2). Tego typu zmiany sugerowały wystąpienie syndromu Alabama Red Leg.

W czasie 8 tygodni odchowu padło 3820 ptaków (14,69%), a 546 sztuk (2,1%) zostało wybrakowanych. Łącznie straty wyniosły 16,79% (4366 sztuk).

Badanie anatomopatologiczne padłych i poddanych eutanazji chorych ptaków wykazało liczne zmiany na skórze oraz w narządach wewnętrznych o charakterze rozrostowym. U większości sekcjonowanych ptaków po odpreparowaniu skóry brodawki piór były powiększone, a w tkance podskórnej widoczne były nacieczenia oraz przekrwienia. U kilku sztuk w mięśniach piersiowych stwierdzono zmiany o charakterze rozrostowym. Zmiany rozrostowe stwierdzono również w wątrobie, śledzionie, nerkach i przedzołądkiem. U ptaków padłych stwierdzono 2-3-krotne powiększenie wątroby i śledziony, silne zgrubienie i stwardnienie ściany przedzołądka oraz przekrwienie płuc. Kość stępowo-śródstopowa była łamliwa i krucha. U wszystkich badanych ptaków bursa Fabrycjusza była atroficzna, wielkości ziarna groszku. Makroskopowo stwierdzono zażółcenie i obrzęk nerwów kulszowych oraz splotów lędźwiowo-krzyżowych.

Badaniem mikroskopowym w wycinkach pobranych ze zmienionych makroskopowo: wątroby, śledziony, nerek, przedzołądka stwierdzano często rozlane (śledziona, wątroba, przedzołądek) lub ogniskowe (nerki) nacieki pleomorficznych komórek limfoidalnych



Ryc. 1. Zmiany rozrostowe skóry w okolicy brzucha



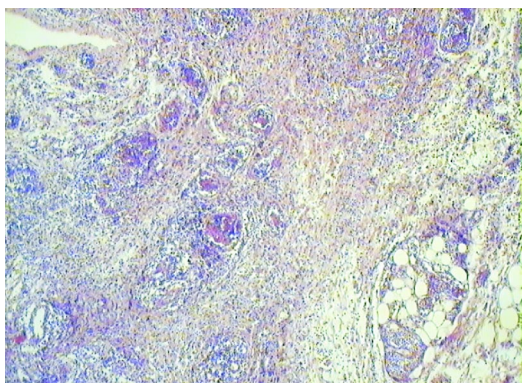
Ryc. 2. Zmiany rozrostowe układające się wzdłuż przebiegu naczyń krwionośnych skoku

typowych i charakterystycznych dla zmian rozrostowych występujących w przebiegu choroby Mareka (4). Ponadto obserwowano nacieki komórek limfoidalnych – ogniskowe lub rozlane w splotach krzyżowo-lędźwiowych oraz w osłonkach nerwowych. Mikroskopowo w bursie Fabrycjusza widoczna była rozległa martwica i ubytek limfocytów w części rdzennej grudek oraz stwierdzono tworzenie się licznych torbieli i struktur gruczołowych. Również liczne nacieki komórek limfoidalnych, zarówno w warstwie powierzchniowej, jak i głębokiej oraz przekrwienia, stwierdzano w zmienionej chorobowo skórze ptaków (ryc. 3). W wycinkach kości obserwowano zanik tkanki kostnej oraz widoczne były w jej obrębie ogniska tkanki chrzęstnej (ryc. 4).

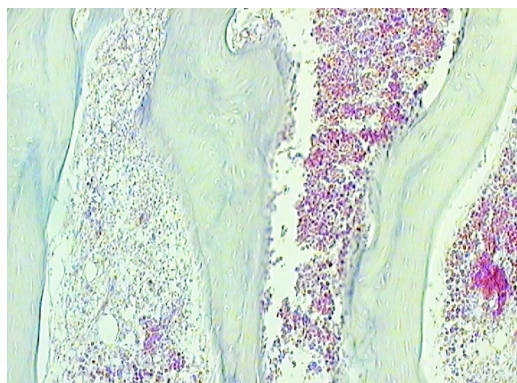
Badanie anatomopatologiczne, jak również badanie histopatologiczne wskazywało na wirus choroby Mareka jako przyczynę zachorowań i zmian makro- i mikroskopowych u brojlerów. Dlatego też podjęto próbę potwierdzenia wirusa choroby Mareka jako czynnika etiologicznego. W tym celu przeprowadzono reakcję amplifikacji (PCR). Użyto starterów specyficznych dla sekwencji genu kodującego białko onkogenne – meq.

Przebadano próbki DNA pochodzące z komórek końcówek piór, z komórek wątroby i śledziony badanych ptaków. Metodą PCR obecność DNA wirusowego stwierdzono we wszystkich próbkach pochodzących z komórek piór i w dwóch próbkach wyizolowanych z komórek wątroby. Otrzymano produkt o wielkości 1,062 bp. W DNA izolowanym ze śledziony nie stwierdzono obecności sekwencji genu meq. Wynik PCR był ujemny. Jak wynika z danych piśmiennictwa, w przypadku zjadliwych szczepów terenowych produkt amplifikacji tego genu ma wielkość 1,062 bp – jest to tak zwana forma „s-meq”. W wyniku atenuacji dochodzi do insercji w obrębie otwartej ramki odczytu (178 bp), co prowadzi do zmiany wielkości produktu na 1,2 kb, forma ta określana jest jako „L-meq” (6-8, 10). Wyniki przeprowadzonej izolacji przy zastosowaniu starterów dla genu meq potwierdziły zakażenie ptaków zjadliwym szczepem wirusa choroby Mareka, bowiem stwierdzono formę „s-meq”. Wyniki PCR przedstawiono na ryc. 5.

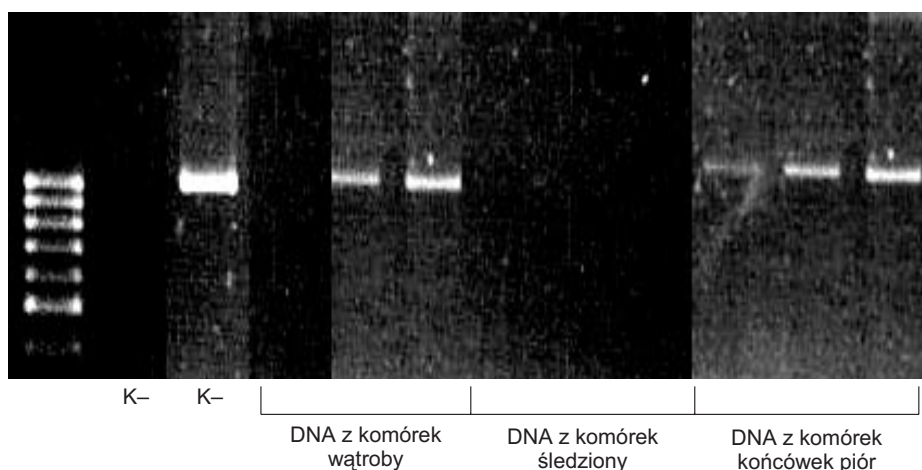
Równoległe próbki DNA poddano amplifikacji, stosując startery charakterystyczne dla sekwencji 132 bp wirusa choroby Mareka. Wynik dodatni otrzymano w przypadku DNA izolowanego z 2 próbek pochodzących z komórek końcówek piór i 1 próbki wyizolowanej z komórek wątroby. Wielkość produktu wynosiła 436 bp i była charakterystyczna dla szczepów terenowych (1-3, 9). Wskazywała ona również na podwójną liczbę powtórzeń sekwencji 132 bp w genomie, a więc ilość charakterystyczną dla szczepów



Ryc. 3. Obraz zmian mikroskopowych w skórze – widoczne liczne nacieki komórek limfoidalnych (HE × 10)



Ryc. 4. Wycinek z kości skoku – widoczny zanik tkanki kostnej oraz ogniska tkanki chrzęstnej (HE × 20)



Ryc. 5. Elektroforetyczna analiza produktów PCR dla genu kodującego białko meq

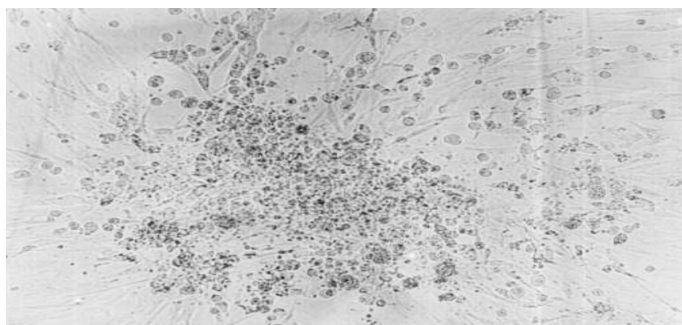
v MDV wirusa choroby Mareka. Szczepy szczepionkowe (np. Rispens CVI 988) posiadają w swoim genomie kilkanaście kopii tej sekwencji, a otrzymany produkt PCR ma wielkość około 1000 bp. W przypadku szczepów zjadliwych wielkość produktu PCR wynosi od 200 do 560 bp, co odpowiada 2-3 kopiom sekwencji 132 bp. Zbiorcze wyniki reakcji PCR przedstawiono w tab. 1. Rozbieżności w wynikach pomiędzy PCR dla genu meq i sekwencji 132 bp wynikają z większej specyficzności starterów dla genu meq w porównaniu do starterów dla sekwencji 132 bp wirusa choroby Mareka.

Na podstawie PCR przeprowadzonego przy użyciu dwóch różnych par starterów wykrywających inne sekwencje genomu wirusa MD, w badanym materiale stwierdzono DNA wirusa MD, co świadczy, że był on

Tab. 1. Zbiorcze wyniki reakcji PCR dla genu meq i sekwencji 132 bp

Próbki*	Startery dla genu meq	Startery dla sekwencji 132 bp
DNA – Wątroba	2**/3***	1/3
DNA – Śledziona	0/3	0/3
DNA – Końcówki piór	3/3	2/3

Objaśnienia: \* – próbki zbiorcze; \*\* – liczba próbek dodatnich; \*\*\* – liczba próbek badanych



Ryc. 6. Efekt cytopatyczny w hodowli CEF – 7 dni po zakażeniu (3. pasaż)

czynnikiem etiologicznym zachorowań w badanym stadzie kurcząt brojlerów.

Dodatkowo przeprowadzono badanie wirusologiczne. W pierwszych pasażach nie stwierdzono w hodowli CEF efektu cytopatycznego. Pojawił się on w postaci drobnych, skupiających się i tworzących ogniska komórek dopiero w trzecim pasażu w 7. dniu inkubacji. Taki efekt cytopatyczny jest charakterystyczny dla wirusa choroby Mareka i obserwowany był tylko w hodowli CEF zakażanej homogenizatami z wątroby (ryc. 6). Nie obserwowano go w 0-5 pasażu w przypadku zaka-

żenia hodowli CEF homogenizatami ze śledziony. Wyniki te potwierdziły wyniki uzyskane w PCR, przy pomocy którego DNA wirusowe wykryto również w komórkach wątroby i komórkach końcówek piór. Materiał uzyskany z komórek piór nie był badany wirusologicznie.

Reasumując, na podstawie objawów klinicznych, zmian anatomopatologicznych oraz kompleksowych badań obejmujących diagnostykę histopatologiczną, molekularną (PCR) oraz wirusologiczną można przyjąć, że przyczyną wystąpienia syndromu „Alabama Red Leg” był zjadliwy szczep wirusa choroby Mareka (v MDV). Obecność tego wirusa stwierdzono w wątrobie i końcówkach piór chorych ptaków.

## Piśmiennictwo

- Barrow A., Venugopal K.: Molecular characteristic of very virulent European MDV isolates. *Acta Virol.* 1999, 43, 90-93.
- Becker Y., Tabot E., Asher Y., Davidson I., Malkinson M., Witter R. L.: PCR detection of amplified 132 bp repeats in Marek's disease virus type 1 (MDV-1) DNA can serve as an indicator of virus virulence. *Virus Genes* 1993, 7, 277-287.
- Bumstead N., Sillibourne J., Rennie M., Ross N., Davison F.: Quantification of Marek's disease virus in chicken lymphocytes using the polymerase chain reaction with fluorescence detection. *J. Virol. Methods* 1997, 65, 75-81.
- Calnek B. W.: Pathogenesis of Marek's disease virus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2001, 255, 25-56.
- Cereno T. N.: Marek's disease condemnation and vaccination. The Western Meeting of Poultry Clinicians and Pathologists – WestVet. 15 October, 2004, s. 1-4, [www.westvet.com](http://www.westvet.com).
- Chang K. S., Lee S. I., Ohashi K., Ibrahim A., Onuma M.: The Detection of the meq gene in chicken infected with Marek's disease virus serotype 1. *J. Vet. Med. Sci.* 2002, 64, 413-417.
- Chang K. S., Ohashi K., Onuma M.: Diversity (Polymorphism) of the meq gene in the Marek's disease virus serotype 1 and MDV – transformed cells. *J. Vet. Sci.* 2002, 84, 1097-1101.
- Davidson I., Weisman Y., Perl S., Malkinson M.: Differential diagnosis of avian tumours by PCR and a case report of MDV 1 infection in turkeys. *Current research on Marek's disease*. Inc. Kennett Square, PA. 1996, 311-316.
- Lee S. I., Takagi M., Ohashi K., Sugimoto C., Onuma M.: Difference in the meq gene between oncogenic and attenuated strains of Marek's disease virus serotype 1. *J. Vet. Med. Sci.* 2000, 62, 287-292.
- Shamblin C. E., Greene N., Arumugaswami V., Dienglewicz R. L., Parcells M. S.: Comparative analysis of Marek's disease virus (MDV) glycoprotein-, lytic antigen pp38- and transformation antigen Meq-encoding genes: association of meq mutations with MDVs of high virulence. *Vet. Microbiol.* 2004, 102, 147-167.

Adres autora: dr hab. Piotr Szeleszczuk, prof. nadzw. SGGW, ul. Mikłajewskiego 4/25, 02-776 Warszawa; e-mail: [Szeleszczuk@alpha.sggw.waw.pl](mailto:Szeleszczuk@alpha.sggw.waw.pl)