

# Monitoring prevalencije divljih i cijepnih sojeva virusa Marekove bolesti pretragom pera i prašine qPCR postupkom na farmama kokoši nesilica

---

Leskovar, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:548159>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI  
STUDIJ *VETERINARSKA MEDICINA*

DIPLOMSKI RAD

Helena Leskovar

Monitoring prevalencije divljih i cijepnih sojeva virusa Marekove bolesti pretragom  
pera i prašine qPCR postupkom na farmama kokoši nesilica

Zagreb, 2024.

Ime i prezime studenta: Helena Leskovar

Zavod za bolesti peradi s klinikom na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Predstojnik: izv. prof. dr. sc. Željko Gottstein

Mentor: izv. prof. dr. sc. Željko Gottstein

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Dr. sc. Liča Lozica
2. Doc. dr. sc. Maja Lukač, DipECZM
3. Izv. prof. dr. sc. Željko Gottstein
4. Doc. dr. sc. Dražen Đuričić

Rad sadržava 29 stranica, 6 slika, 2 tablice i 25 literaturnih navoda.

## ZAHVALE

*Želim se zahvaliti svom mentoru izv. prof. dr. sc. Željku Gottstein na iznimnom razumijevanju i suradnji tijekom pisanja ovog diplomskog rada. Hvala vam što ste bili uvijek na raspolaganju i od velike pomoći.*

*Zahvaljujem se cijeloj svojoj obitelji na podršci tijekom cijelog studija i bezuvjetnoj ljubavi. Posebne zahvale mami i tati koji su uvijek bili uz mene.*

*Zahvaljujem se svim svojim kolegama i kolegicama Niki, Maci, Heleni, Leu, Josipi, Marinki, Hani, i Ivanu koji su ovih par godina studiranja učinili izdržljivim.*

*Posebne zahvale Luni, Mikiju i Sani.*



## KRATICE

BAC - umjetni bakterijski kromosom

DNA – deoksiribunukleinka kiselina

MB – Marekova bolest

meq - ( MDV EcoRi-Q)

RNA- ribonukleinska kiselina

VMB – virus Marekove bolesti

## POPIS PRILOGA

### Popis tablica

Tablica 1. Početnice za qPCR reakciju specifične za pp38 gen VMB-a

Tablica 2. Rezultati dokaza cjepnog soja CVI988 i divljeg soja VMB u uzorcima pera i prašine po jatima.

### Popis slika:

Slika 1. Kokoš s obje paralizirane noge.

Slika 2. Zadebljanje ishijadičnog živca.

Slika 3. "Sivo oko" (depigmentirana šarenica) i zjenica nepravilnog izgleda.

Slika 4. Multipli limfomi u plućima.

Slika 5. Neoplastične promjene jajnika s prikazom različite morfologije limfoidnih stanica.

Slika 6. Udio pozitivnih uzoraka na cjepni soj CVI988 i divlji soj VMB u uzorcima pera.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA.....	2
2.1 ETIOLOGIJA.....	2
2.2 KLINIČKA SLIKA.....	4
2.3. PATOMORFOLOŠKE PROMJENE.....	7
2.3.1. VIREMIJA.....	7
2.3.2. PARENHIMATOZNO TKIVO.....	7
2.3.3. PERIFERNA NEUROPATIJA.....	7
2.3.4 SREDIŠNJI ŽIVČANI SUSTAV.....	8
2.3.5. LIMFOMATOZA.....	8
2.3.6. ATEROSKLEROZA.....	8
2.3.7. PROMJENE NA OKU.....	9
2.4. BIOSIGURNOST.....	10
2.5. IMUNOPROFILAKSA.....	12
2.6. MONITORING.....	14
3. MATERIJALI I METODE.....	16
3.1 UZORCI I UZORKOVANJE.....	16
3.2. IZDVAJANJE DNA.....	16
3.3. QPCR REAKCIJA.....	17
3.4. STATISTIČKA ANALIZA.....	17
4. REZULTATI.....	18
5. RASPRAVA.....	20
6. ZAKLJUČCI.....	22
7. LITERATURA.....	23
8. SAŽETAK.....	26
9. SUMMARY.....	27
10. ŽIVOTOPIS.....	28

## 1. UVOD

Marekova bolest (MB) je prvi put opisana od strane mađarskog veterinara Jozsefa Mareka 1907. godine kao periferna paraliza kokoši (polineuritis), a kasnije povezana s nastankom limfoidnih neoplastičnih promjena (PASTORET, 2004.). Uzrok ove bolesti leži u onkogenom virusu Marekove bolesti (VMB) iz porodice Herpesviridae. MB ima značajan ekonomski utjecaj zbog stvaranja neoplazija i imunosupresije kod kokoši te u manjoj mjeri kod purana (DAVIDSON, 2020.). Ova bolest predstavlja izazov za peradarsku industriju i zahtijeva kontinuirane napore u kontroli i prevenciji kako bi se ograničili gubici u proizvodnji peradi.

Neoplazije virusnog podrijetla u peradi uzrokuju smanjenu produktivnost životinja, visok morbiditet i mortalitet ptica u razdoblju rasta s učestalim isključivanjem jedinki s linije klanja (DAVIDSON, 2020.). Ova bolest nema zoonotski potencijali i nije od značajnosti za javno zdravlje, ali iz organoleptičkih razloga takve se životinje isključuju pri klanju ((DAVIDSON, 2020.). Zbog tih činjenica bitno je kontrolirati pojavu ove bolesti što se i postiže širokim programima cijepljenja čime je MB prva onkogeno bolest koja je pod uspješnim nadzorom zbog upotrebe učinkovitog cjepiva (HAO i sur.,2021.).

Cjepiva protiv VMB smanjuju učestalost pojavljivanja neoplazija i smrtnosti peradi, ali ne zaštićuju jedinke od superinfekcija, replikacije i izlučivanja patogenog VMB (RALAPANAWA i sur., 2015.). VMB replicira se i izlučuje iz epitela pernih folikula u kokoši koje su zaražene ili cijepljene virusom i zato su se uzorci perja pokazali jednostavnom i neinvazivnom metodom za dobivanje uzoraka kojima se može dokazati prisutnost virusa pomoću RealTime PCR metode. Na taj način može se odrediti prevalencija cijepnih i divljih sojeva virusa (DAVIDSON, 2017.).

Cilj ovog diplomskog rada je monitoring dinamike prevalencije cijepnih i divljih sojeva VMB na farmama kokoši nesilica cijepljenih protiv Marekove bolesti.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1 ETIOLOGIJA

Virus Marekove bolesti posjeduje dvolančanu DNK i spada u rod *Mardivirus*, porodice *Herpesviridae*, potporodice *Alphaherpesvirinae*. Unutar roda *Mardivirus* nalaze se 3 serotipa koja se razlikuju prema svojim onkogenim svojstvima. Serotip 1 (*Gallid alphaherpesvirus 2*) obuhvaća sve onkogene sojeve i njihove oslabljene oblike, dok serotip 2 predstavlja neonkogene viruse izolirane iz kokoši (*Gallid alphaherpesvirus 3*). Serotip 3 čine neonkogeni virusi izolirani iz purana (*Meleagrid alphaherpesvirus 1*) (GIMENO, 2008.). Marekovu bolest uzrokuju samo sojevi *Gallid alphaherpesvirus 2*.

Nadalje, VMB može se još detaljnije klasificirati na temelju virulencije. Jedan od čestih klasifikacijskih sustava dijeli serotip 1 na blagi (mVMB), virulentan (vVMB), jako virulentan (vvVMB) te jako virulentan plus (vv+VMB) soj virusa (ISLAM i sur., 2014.).

Sva tri predstavnika roda *Mardivirus* imaju sličan genom i linearni raspored, uz manje varijacije u sastavu gena i sadržaju nukleotida. Najveću razliku predstavlja prisustvo meq (MDV EcoRI-Q) gena, koji je specifičan za serotip 1 (*Gallid alphaherpesvirus 2*) (OSTERRIEDER i sur., 2004.). Na temelju istraživanja i dokaza meq gen je glavni uzrok onkogenosti VMB, dok ostali geni služe za obavljanje sporednih funkcija. MDV-EcoRI-Q (Meq) je virusni protein, specifično i visoko ispoljen u jezgrama tumorskih stanica i tumorskim staničnim linijama Marekove bolesti. Meq protein je kodiran jedinstvenim MDV meq genom i predstavlja protein sličan onkoproteinima poznatim kao Fos/Jun obitelj (NAIR i KUNG, 2004.). Fosoprotein 38 (pp38) je još jedan protein specifičan za Marekovu bolest. Njegova uloga u transformaciji stanica je manja nego što se izvorno smatralo, ali se pokazalo da više sudjeluje u litičkim stadijima. Protein pp 38 čini kompleks dvaju fosfoproteina, pp24 i pp38, koji dolaze do izražaja tijekom citolitičkog stadija stanica i pri proliferaciji limfoblastoidnih stanica (NAIR i KUNG, 2004.).

Prirodan put širenja VMB odvija se preko respiratornog trakta nakon udisanja virusa prisutnog u prašini koja sadrži ostatke detritusa epitela pernih folikula zaraženih jediniki. VMB širi se horizontalnim putem i nisu zabilježeni vertikalni načini infekcije, a infekciji su podložne sve dobne kategorije kokoši (GIMENO, 2008.). Jedinom kada se virus nađe u domaćinu, prolazi kroz inkubacijski period od tjedan dana nakon kojeg se nove virusne čestice izlučuju iz epitela pernih

folikula. Patogeneza je MB kompleksna i može se podijeliti na 4 glavne faze: ulazak, replikacija, latencija i širenje. Početna je replikacija virusa zabilježena u makrofagima i B stanicama pluća zaraženih životinja. Fagocitne stanice, poput makrofaga, smatraju se da prenose virus do regionalnog limfatičnog tkiva, burze Fabricij i slezene gdje ostale stanice imunskog sustava budu zaražene. Makrofagi i dendritične stanice podržavaju replikaciju VMB i stanični prijenos *in vitro*. VMB izlučuje virusni kemokin koji se zove CXCL13 i njegova uloga je u regrutaciji B stanica i CD4<sup>+</sup>T stanica. Virusna replikacija događa se u nekoliko različitih stanica, dok B stanice predstavljaju najveći dio tih stanica. Zaražene B stanice mogu se lako otkriti u zaraženim kokošima i najviše su podložne litičkoj replikaciji. Latencijska faza započinje unutar jednog tjedna od infekcije, uglavnom u T limfocitima CD4<sup>+</sup>. Latentno inficirane CD4<sup>+</sup>T stanice u necijepljenih kokoši genski su podložnije transformaciji i stvaranju neoplazija te mogu diseminirati VMB do epitela pernih folikula gdje se dalje nastavlja replikacija. Tijekom latentne faze CD4<sup>+</sup>T stanica produktivna (litička) faza je suprimirana i ekspresija stanične apoptoze je zaustavljena (TULI i FAYISA, 2023.). Ubrzano stvaranje limfoma T stanica jedna je od najznačajnijih karakteristika zaraze VMB jer se pokazalo da se neoplazije uzorkovane VMB uglavnom sastoje od T stanica (> 60%) koje su u velikoj mjeri transformirane i klonirane CD4<sup>+</sup>T stanice (BERTZBACH i sur., 2020.).

Produktivna infekcija koja se odvija u epitelu pernih folikula od osobite je važnosti zbog svoje uloge u prijenosu ove bolesti. Jedino u epitelu pernih folikula virus nije vezan za stanicu. Umnažanje VMB u epitelu pernih folikula odvija se kako kod osjetljivih kokoši, tako i kod onih koje su rezistentne na VMB. Imunoprofilaksa ne sprječava umnažanje ovog virusa, ali je značajno reducira. Smatra se da VMB u epitel pernih folikula dolazi inficiranim limfocitima preko dermalnih perifolikularnih limfoidnih agregata koji se mogu uočiti već sedmi dan poslije infekcije. Prijenos VMB do epitela pernog folikula dalje se odvija cijeli životni vijek kokoši. Latentno inficirani T-limfociti mogu biti podvrgnuti transformaciji čiji je rezultat stvaranje limfoma. Transformacija se može dogoditi u limfocitima prisutnima u bilo kojem tkivu, stoga se limfom uzrokovan VMB mogu naći u živcima, mozgu, koži i bilo kojem visceralnom organu (GIMENO, 2008.).

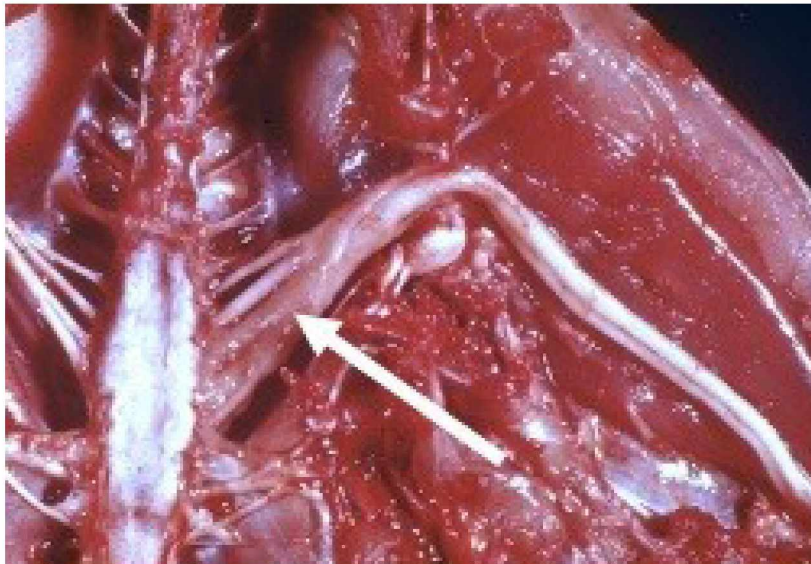
## 2.2 KLINIČKA SLIKA

Tipične indikacije za infekciju jata virusom Marekove bolesti uključuju paralizu kao rezultat limfoidne infiltracije perifernih živaca, limfomi na različitim organima, imunosupresija, depresija, sljepoća i lezije na koži. Pored ovih znakova mogu se javiti i netipični znakovi poput gubitka mase, anoreksije, anemije, visoki mortalitet i morbiditet (DAVIDSON, 2020.). Bolest se očituje u dva oblika, klasičnom i akutnom.

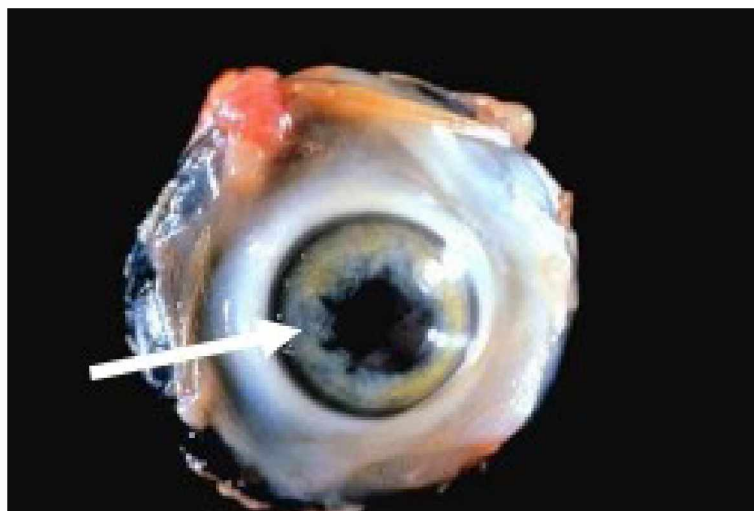
Klasični je oblik neurološki oblik bolesti u kojem dolazi do paralize. Zahvaća periferne živce kod kojih dolazi do zadebljanja što posljedično uzrokuje paralizu (Slika 1). Najčešće se klinički manifestira uslijed promjena na brahijalnom i ishijadičnom živcu, ali mogu biti zahvaćeni i drugi živci. Zahvaćeni živci su dva do tri puta deblji (Slika 2) te su sive boje (ZELNIK, 2004.). Mogu se uočiti jedinke kako leže na podu zbog parcijalne ili kompletne paralize nogu i krila. U klasični oblik još se ubraja i očni oblik. Karakteristika očnog oblika su promjene u oku koje dovode do promjene boje šarenice oka u sivu pa se još simptom naziva i "sivo oko", uz nepravilan oblik zjenice (Slika 2). Do promjene dolazi zbog upale i infiltracije šarenice što rezultira depigmentacijom inače narančaste šarenice (WOAH, 2023.).



Slika 1. Kokoš s obje paralizirane noge (TILLEY i sur., 2013.).



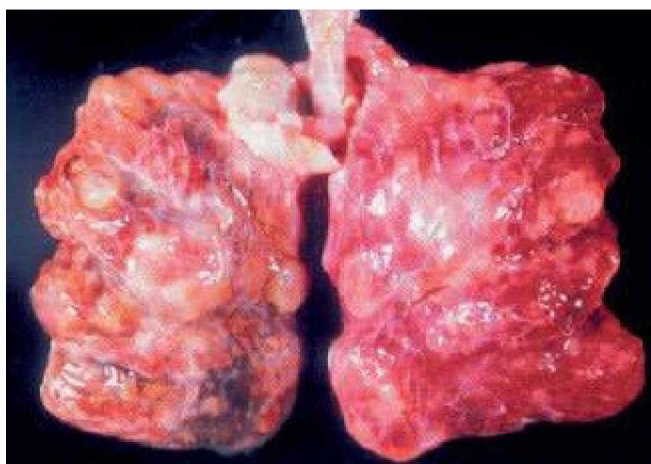
Slika 2. Zadebljani ishijadični živac (strelica) (TILLEY i sur., 2013.).



Slika 3. "Sivo oko" (depigmentirana šarenica) i zjenica nepravilnog izgleda (TILLEY i sur., 2013.).



Akutni oblik Marekove bolesti karakteriziran je naglom pojavom bolesti u jatuu, što rezultira iznenadnim uginućem velikog broja ptica. Životinje mogu uginuti bez prethodnih simptoma ili se primijeti nagli razvoj ataksije, paralize i depresije. Kod nekih životinja razvije se encefalitis sa prolaznom paralizom koja traje 24-36 sati. Životinje koje obole, u pravilu se ne oporave jer kasnije obole od klasičnog tipa (WOAH, 2023.). Akutni oblik karakterizira i infiltracija organa neoplastičnim stanicama i razvoj limfoma (Slika 4).



Slika 4. Multipli limfomi u plućima (NAIR i sur., 2020.).

## 2.3. PATOMORFOLOŠKE PROMJENE

### 2.3.1. VIREMIJA

Infekcija VMB popraćena je ranom i perzistentnom viremijom. Virus se ne nalazi slobodan u plazmi već isključivo unutarstanično, najčešće u limfocitima. Unutar 5 dana od infekcije dolazi do zaražavanja koštane srži, a kod pilića koji nemaju majčinska antitijela može rezultirati aplazijom srži i anemijom. Ekstravaskularna hemolitička anemija nastaje fagocitozom crvenih krvnih stanica. Tijekom akutne citolitičke faze infekcije virulentnim VMB zabilježeno je povećanje broja B limfocita, T limfocita, heterofila, a smanjenje broja monocita i eozinofila u krvi. Kasnije, u limfoproliferativnoj fazi, dolazi do povećanja broja T limfocita, dok je broj B limfocita, monocita, heterofila i bazofila smanjen, što kod nekih ptica dovodi do leukemije (PAYNE, 2004.).

### 2.3.2. PARENHIMATOZNO TKIVO

Infekcija parenhimatoznog tkiva uglavnom je obilježena citolizom i često prisutnošću intranuklearnih inkluzijskih tjelešaca u nadbubrežnoj žlijezdi, bubrezima, jetri, gušterači i proventrikulu. U bubrezima se opaža glomerulopatija povezana s imunim kompleksima, koja se javlja kod kokoši i prepelica, uz prisutnost antinuklearnih protutijela (PAYNE, 2004.).

### 2.3.3. PERIFERNA NEUROPATIJA

Jedna od karakteristika klasičnog tipa Marekove bolesti je stanična infiltracija perifernih živaca i njihovo zadebljanje, što posljedično uzrokuje paralizu. Ovaj tip kliničkih znakova češće je uočen kod infekcije s virulentnijim tipom virusa i limfomatoznom obliku bolesti. Intraneuralna infiltracija sastoji se većinom od makrofaga i nekih limfocita (PAYNE, 2004.). U perifernim živcima razlikuju se tip A i tip B lezija. Akumulacija i proliferacija limfoidnih stanica naziva se A-tip lezije. Limfoproliferacija izgleda poput neoplastične lezije koja se sastoji tipično od mješane populacije malih, srednjih i velikih limfocita i makrofaga. Potpuno razvijeni A-tip lezije popraćen je i demijelinizacijom te proliferacijom Schwannovih stanica. Prijašnja istraživanja ukazuju da je jedan od faktora demijelinizacije imunološkog tipa uzrokovano migracijom makrofaga i limfoidnih stanica u periferno živčano tkivo. B-tip lezije uglavnom je upalnih karakteristika te je opisana

difuzna, blaga do umjerena infiltracija malih limfocita i plazma stanica, često uz pojavu edema, te samo ponekad demijelinizacijom i proliferacijom Schwannovih stanica. Ova dva tipa lezija mogu se uočiti u različitim živcima iste jedinice ili čak u istom živcu, ali na različitim mjestima (NAIR i sur., 2020.).

#### 2.3.4 SREDIŠNJI ŽIVČANI SUSTAV

Među lezijama u središnjem živčanom sustavu najčešće su uočena blaga perivaskularna infiltracija zrelih limfocitima i makrofagima. Povremeno se bilježe mikrogliozna i astrocitoza. Isprva nisu zabilježeni nikakvi klinički znakovi, sve do 1959. godine, kada je opisan sindrom nagle paralize, osobito u području vrata i nogu. Ova paraliza bi trajala 24-36 sati, nakon čega bi uslijedio potpuni oporavak (PAYNE, 2004.).

#### 2.3.5. LIMFOMATOZA

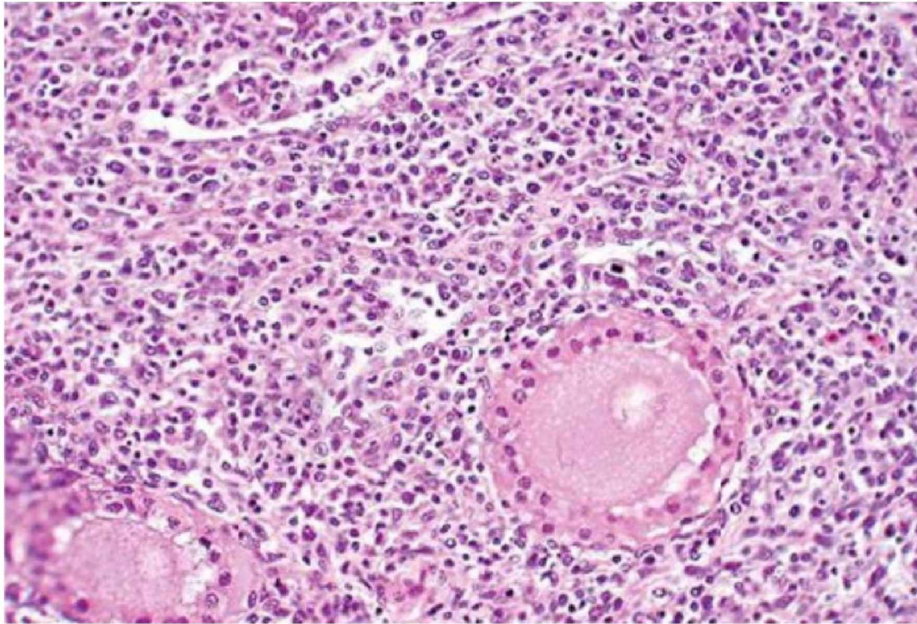
Već u prvom tjednu nakon infekcije, u različitim tkivima započinje multifokalna limfoidna proliferacija koja postaje sve izraženija te dovodi do fatalne difuzne limfomatoze unutar tri tjedna. Visceralni organi i druga često zahvaćena mjesta uključuju spolne žlijezde, jetru, bubrege, slezenu, srce, proventrikul, burzu, skeletne mišiće i kožu (Slika 5). Također, često su pogođeni i periferni živci. Limfoidne su stanice tipično pleomorfne i razlikuju se od malih do velikih stanica. Limfomi Marekove bolesti citološki su kompleksni i sastoje se od neoplastično transformiranih T-stanica i različitih drugih stanica (CD4+ i CD8-, B-stanica, makrofaga, NK-stanica), koje su zajedno uključene u imunološke reakcije protiv transformiranih stanica (PAYNE, 2004.).

#### 2.3.6. ATEROSKLEROZA

VMB potiče nekrozu medijalnog sloja arterija što se smatra početnom promjenom u razvoju ateroskleroze. Metodom imunofluorescencije uočeni su antigeni VMB u medijalnom sloju. U arterijama i venama zaraženih ptica uočena je i endotelna hiperplazija (PAYNE, 2004.).

### 2.3.7. PROMJENE NA OKU

Jedan od često uočenih znakova Marekove bolesti je sljepoća. U oku dolazi do infiltracije upalnih stanica u rožnici, uvealnom traktu, mrežnici i pektenu oka, pojavljuju se intranuklearna inkluzijska tjelešca te dolazi do degeneracije fotoreceptora i ostalih stanica oka (PAYNE, 2004.).



Slika 5. Neoplastične promjene jajnika s prikazom različite morfologije limfoidnih stanica (NAIR i sur., 2020.).

## 2.4. BIOSIGURNOST

Bez učinkovite strategije za kontrolu Marekove bolesti, posljedice na peradarsku industriju mogu biti razorne. Kontrola MB zasniva se na tri glavne točke: imunoprofilaksa, biosigurnost i genska rezistentnost.

Samo cijepljenje neće spriječiti zarazu s VMB. Vrlo je bitno slijediti opće mjere biosigurnosti na farmama peradi kako bi se osiguralo da pilići steknu imunitet prije nego budu izloženi virusu. Neke od općih mjera uključuju pravilan izbor odabira lokacije za izgradnju farme, makro i mikrolokacije, udaljenost od ostalih farmi bilo peradarskih ili drugih, kontrola ulaska i izlaska osoblja na farmi, izgradnja ograde oko farme, pravilno korištenje dezinfekcijskih barijera. Osnova preventive mnogih zaraznih bolesti je i sustavno provođenje DDD mjera odnosno dezinfekcije, dezinsekcije i deratizacije. Piliće bi trebalo držati odvojeno od odraslih ptica kako ne bi rano došli u kontakt sa zaraženim perjem i prašinom. Na kraju svakog ciklusa uzgoja trebalo bi provoditi standardne higijenske mjere uključujući čišćenje i dezinfekciju objekta i opreme te odmor objekta.

Korištenjem specifičnih jata slobodnih od patogena, MB bi se mogla iskorijeniti s farme ako se idealno pridržava biosigurnosnih mjera. Postupci za sprječavanje, suzbijanje i iskorjenjivanje zarazne bolesti uvelike smanjuju rizik, ali nažalost neke od njih u peradarskoj industriji nisu ekonomski isplative. U biosigurnosnom planu postoje dvije ključne točke koje bi trebale smanjiti prisutnost virusa na farmama, sprječavajući ulazak i izlazak virusa iz objekta, čime se izbjegava kontaminacija okoliša. Idealno bi bilo primjenjivati sustav all-in all-out te održavati jednu dobnu skupinu unutar objekta kako bi se smanjila količina virusa na farmama. Međutim, ove mjere se često ne provode dosljedno (GIMENO, 2004.).

Druge mjere koje se odnose na sprječavanje kontaminacije okoliša s virusom, a nisu često dovoljno prepoznate, su kontrola zraka i zbrinjavanje lešina. Postoje biofilteri čija je uloga uklanjanje neugodnih mirisa u objektima za proizvodnju životinja. Takvi filteri mogli bi se koristiti u peradarskoj industriji za smanjenje količine virusa MB u zraku u objektima za proizvodnja životinja. Zbrinjavanje samih lešina također bi imalo ulogu u sprječavanju dolaska virusa u okoliš. Lešine se uobičajeno ili spaljuju ili zakapaju, ali ne pridonosi se dovoljan značaj zbrinjavanja gnoja. (GIMENO, 2004.).

Važnost genske rezistentnosti zabilježena je još 1968. godine. Procjene nasljednosti otpornosti na Marekovu bolest relativno su visoke u usporedbi s otpornošću na druge bolesti kod kokoši i drugih domaćih životinja. Stoga je ključno definirati i razumjeti čimbenike koji kontroliraju genetsku otpornost, posebno kada se ta otpornost može odabrati i koristiti u kombinaciji s drugim metodama za kontrolu Marekove bolesti, kao što su cijepljenje i liječenje (BUMSTEAD i KAUFMAN, 2004.). Postoje dvije skupine gena u pilića koje utječu na otpornost na Marekovu bolest: geni glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC) i ne-MHC geni. (GIMENO, 2014.). Uz trenutne zabrinutosti zbog sve agresivnijih režima cijepljenja protiv MB, koji potiču razvoj VMB-a s povećanom virulentnošću, postoji veći interes za korištenje genetske selekcije kako bi se poboljšala otpornost na MB kod modernih rasplodnih životinja. Ovaj cilj može se postići konvencionalnom selekcijom i uzgojem. Dostupnost novih tehnologija poput DNA sekvenciranja i RNA interferencije, zajedno s već dostupnom sekvencom kokošjeg genoma, trebala bi revolucionirati identifikaciju gena otpornosti na MB. Za identifikaciju gena otpornosti na bolesti kod kokoši, trenutno se primjenjuje trostruki integrirani genomski pristup. Na razini DNA-a, skeniranje kvantitativnih lokusa svojstava, koristeći genetske markere za identifikaciju područja unutar genoma gdje se mogu pronaći svojstva otpornosti (GIMENO, 2008.). Na razini RNA-a, DNA mikronizovi služili su za identifikaciju gena koji se razlikuju u ekspresiji između ptica otpornih na bolest i onih osjetljivih na bolest. Konačno, na razini proteina, nedavno su proučavane interakcije između VMB-a i proteina pilića. Neki od markera identificiranih ovim integriranim pristupom evaluirani su kod komercijalnih linija nesilica i mogli bi biti korisni za poboljšanje selekcije otpornijih pilića (GIMENO, 2008.). Genetska otpornost kod pilića može pružiti održivija sredstva za sprječavanje izbijanja Marekove bolesti u budućnosti (BUMSTEAD i KAUFMAN, 2004.)

Dva su uvjeta potrebna za racionalan razvoj novih strategija kontrole: osnovno poznavanje sustava VMB-domaćin za identifikaciju ciljnih gena i odgovarajuće tehnike za manipuliranje VMB i genomima kokoši. Razumijevanje molekularne patogeneze VMB-a ključno je za učinkovitu kontrolu Marekove bolesti. Tri su glavna područja istraživanja: molekularni mehanizmi koji sudjeluju u latenciji, molekularni mehanizmi onkogeneze i mehanizmi putem kojih VMB inficira stanice, replicira se u epitelu pernih folikula te se prenosi na druge jedinke (GIMENO, 2004.).

## 2.5. IMUNOPROFILAKSA

Imunoprofilaksa Marekove bolesti prvi je primjer uspješne masovne primjene cjepiva koje štiti protiv neoplazije izazvane virusom. Patogeni VMB može se atenuirati pasažom na staničnoj kulturi, a broj potrebnih pasaža ovisi o soju virusa (BUBLOT i SHARMA, 2004.). Živo cjepivo primjenjuje se jednodnevnim pilićima ili *in ovo* zamecima starim 18 dana, subkutano ili intramuskularno (DAVISON i KAISER, 2004.). Primjena *in ovo* cjepiva protiv VMB-a rezultira boljom zaštitom od rane zaraze i ima pozitivan učinak na imunološki sustav pilića te njihove reakcije na druge nesrodne antigene. Nadalje, *in ovo* primjena cjepiva protiv VMB, praćena dodatnom dozom u trenutku leženja, može poboljšati zaštitu od rane zaraze visoko patogenim sojevima u terenskim uvjetima. Takvi uvjeti uključuju područja s velikom koncentracijom farmi peradi, farme koje drže životinje različite dobi, ponovna upotreba stelje te transport jednodnevnih pilića na velike udaljenosti nakon leženja (ROSALLES, 2018.).

Razlikujemo 3 cjepiva protiv VMB-a.. Prvo razvijeno cijepivo temeljilo se na herpesvirusu purana (HVT) serotip 3. Izolat apatogenog soja štiti protiv VMB-a niske virulencije. HVT cjepivo može biti stanično vezano (BUBLOT i SHARMA, 2004.), no razvijen je i liofilizirani oblik ovog cjepiva koji nije stanično vezan, i poznat je po svojoj širokoj primjenjivosti zbog lakog skladištenja (DAVIDSON, 2020.). Nedostatak ovog cjepiva je njegova podložnost neutralizaciji od strane materlnih protutijela što ga čini korisnim samo protiv virulentnih sojeva VMB, ali ne i vrlo virulentnih (DAVIDSON, 2020.). Drugo cjepivo nastalo je od prirodnog neonkogenog VMB (serotip 2). Ovo cjepivo pokazalo je zaštitu protiv patogenih sojeva serotipa 1 (BUBLOT i SHARMA, 2004.). Kako bi se povećala zaštita ovog cjepiva protiv novijih, virulentnijih sojeva, zajedno se primjenjivalo s HVT cjepivom. Ovakvo bivalentno cjepivo pokazalo je odličnu zaštitu protiv vrlo virulentnih sojeva (DAVIDSON, 2020.). Treća kategorija cjepiva koje se koristi nastala je od atenuiranog onkogenog virusa MB (serotip 1) soj CVI988. Naziva se još i Rispens sojem. U početku su Rispens i HVT cjepivo pokazivali sličnu razinu zaštite, ali kasnije se pokazalo da Rispens cjepivo iskazuje bolju zaštitu protiv vrlo virulentnih sojeva i smatra se "zlatnim standardom" u zaštiti protiv VMB. Najčešće se ovo cjepivo primjenjuje pilićima dobi jedan dan (BUBLOT i SHARMA, 2004.). Sva cjepiva štite protiv mortaliteta, kliničkih znakova i učestalosti pojavljivanja lezija, ali nijedno ne pruža zaštitu od infekcije, replikacije i izlučivanja divljeg virusa (BUBLOT i SHARMA, 2004.).

Iako se korištenje cjepiva pokazalo uvelike korisnim u peradarskoj industriji, široka primjena cjepiva dovela je i do nekih negativnih posljedica. U praksi, postalo je uobičajeno primijeniti cjepivo protiv VMB zajedno s drugim cjepivima i/ili antibioticima. Takvi postupci trebali bi se pažljivije razmatrati jer su prepoznati negativni efekti nekih antibiotika na kvalitetu cjepiva protiv VMB. Nadalje, javlja se problem evolucije virusa VMB prema više virulentnim sojevima. U SAD-u je uočena progresija virulencije VMB i to nekoliko godina nakon uvođenja novog cjepiva na tržište. Teško je predvidjeti kada će i trenutačno najučinkovitije cjepivo Rispens izgubiti svoju učinkovitost (GIMENO, 2004.).

Mogu se razmatrati dva aspekta cjepiva u kojima se može napredovati. Prvi je taj da trenutačno dostupna cjepiva na tržištu ne induciraju sterilnu imunost niti sprječavaju nakupljanje virusa. Time se povećava rizik za evoluciju virusa. Drugi aspekt cjepiva je njihova stanična vezanost, skupa proizvodnja i samo skladištenje cjepiva. Na tržištu postoje stanično nevezana, liofilizirana cjepiva, ali njihova je djelotvornost smanjena u prisustvu materijalnih protutijela (GIMENO, 2004.).

U budućnosti, bit će potrebno pronaći učinkovitija cjepiva protiv Marekove bolesti i razviti održive strategije kako bi se spriječio daljnji razvoj virusa Marekove bolesti prema većoj virulentnosti. Međutim, sprječavanje takve evolucije bit će izazovno, te je potraga za učinkovitijim cjepivima od presudne važnosti (GIMENO, 2004.).



## 2.6. MONITORING

Nedostatak komercijalnih seroloških setova otežava kontrolu pravilne primjene cjepiva protiv VMB-a, kao i procjenu imuniteta koji se razvija nakon cijepljenja. Iz tog razloga razvijene su druge strategije koristeći molekularne tehnike koje su sposobne pratiti kretanje virusa kod cijepljenih životinja (BARTOLOMÉ i BERNAL, 2020.).

Eksperimentalno je vrlo korisno istovremeno mjeriti cijepne i divlje sojeve VMB kod pojedinačnih ptica radi boljeg razumijevanja mehanizama cijepne zaštite i razlike u učinkovitosti između cjepiva. Također je korisno komercijalno za identifikaciju uzroka neuspješne imunoprofilakse, kao što su primjena suboptimalne doze cjepiva, ometanje replikacije cjepnog virusa majčinim antitijelima, i infekcija hipervirulentnim divljim sojevima virusa Marekove bolesti (BAIGENT i sur., 2011.).

DAVIDSON i sur. (2017.) u svom radu opisuju novu metodu evaluacije procesa cijepljenja sekvencijalnim praćenjem cjepnih virusa u perju. Skupljanje perja je jednostavno, neinvazivno i bez ozbiljnih posljedica za zdravlje ptice, stoga idealno u svrhu praćenja. Da bi se pokazala prisutnost cjepnog virusa, primijenjena je metoda qPCR-a jer je prisutnost cjepnih virusa *in vivo* manje obilna u usporedbi s virulentnim divljim sojevima (BAIGENT i sur., 2011.). Divlje sojeve i cjepni soj Rispens/CVI-988 karakteriziraju male genske razlike. Ipak, količina cjepiva prisutna u životinji može se specifično odrediti tehnikom visoko afinitetne metode qPCR-a u uzorcima pera (BARTOLOMÉ i BERNAL, 2020.). Cjepni virus Rispens/CVI988, u perju komercijalnog jata, može se dokazati od 4. do 7. dana i najmanje 3 mjeseca nakon cijepljenja (BAIGENT i sur., 2011.). Obično primjenu cjepiva prati mjerenje razine antitijela nakon cijepljenja, no taj pristup je neizravan i nije univerzalno primjenjiv za viruse koji izazivaju uglavnom stanično posredovane imunološke odgovore. Ne postoje izravni testovi za evaluaciju primjene cjepiva, stoga se koristi test praćenjem širenja živih cjepnih virusa sustavno, njihovom detekcijom u badrljicama pera cijepljenih ptica (DAVIDSON i sur., 2017.).

Sojevi VMB-a repliciraju se u epitelnim stanicama folikula pera, u limfocitima i mijelocitima koji cirkuliraju i dolaze do šupljine kalama perja te se tamo nakupljaju, tvoreći pulpu pera koja predstavlja sistemsku krv. Praćenje unosa cjepiva analizom perja mnogo točnije prikazuje unos cijepnog virusa nego analiza prašine jer se prašina kumulativno odražava na sve ptice u peradnjaku tijekom duljeg vremenskog razdoblja (DAVIDSON i sur., 2017).

Iako diferencijacija divljeg tipa soja cjepiva CVI988/Rispens od patogenih izolata VMB-a još uvijek predstavlja veliki izazov, razvoj pCVI988, infektivnog klona bakterijskog umjetnog kromosoma (BAC) sa CVI988 vektorskom sekvencom, omogućio je njegovu uporabu kao markera virusa za razvoj i validaciju qPCR testova za kvantifikaciju i razlikovanje između CVI988 i virulentnog MDV-a (BAIGENT i sur., 2011.).

PCR test se primjenjuje na uzorcima perja uzetim od pilića u komercijalnom uzgoju. Vrijeme između sedamnaestog i dvadeset prvog dana nakon cijepjenja smatra se prikladnim za uzorkovanje perja za dokaz soja CVI988. Ovo se temelji na nekoliko činjenica. Prvo, kod eksperimentalnih pilića, vrhunac prisutnosti cijepnog soja virusa u perju je između četrnaestog i dvadeset prvog dana poslije primjene. U to vrijeme nakon cijepjenja, CVI988 bi trebao biti u latentnoj fazi, što bi trebalo značiti manju varijabilnost među pilićima. qPCR test na uzorcima perja također pruža mogućnost istraživanja drugih aspekata cijepjenja. Pokazalo se da genetska pozadina domaćina utječe na zaštitu od cjepiva, ali nije poznato da li i kako to utječe na razlike u kinetici replikacije cijepnog virusa i količini virusa (BAIGENT i sur., 2006).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 UZORCI I UZORKOVANJE

Kao materijal za pretragu za dokaz cjepnog i divljeg soja VMB korišteni su uzorci pera i prašine iz objekta. Na farmi 1 uzeti su uzorci od 12 ženskih pilića lake linije u jatu J1 i od 10 ženskih pilića lake linije u jatu J2, u dobi 3 tjedna. Na farmi 2 uzeti su uzorci pera od po 5 kokoši lake linije po jatu u 5 jata (K1, K3, K4, K5 i V3) različite dobi, kao i uzorci prašine u objektima navedenih jata.

#### 3.2. IZDVAJANJE DNA

Za dokaz cjepnog virusa CVI988 i divljeg soja VMB-a iz uzetih uzoraka izdvojena je ukupna DNA primjenom dviju metoda.

Iz uzoraka pera ukupna DNA je izdvojena korištenjem alkalne ekstrakcije (MALAGO i sur., 2002). Sukladno postupku izdvajanje ukupne DNA iz pera provedeno je na način da je u epruvetu od 2 ml usitnjeno 5 badrljica pera po jedinki. Potom je na narezane badrljice dodano 20  $\mu\text{L}$  0.2 N NaOH te su inkubirane 20 min na 75 °C. Nakon inkubacije u inkubiranu otopinu dodano je 180  $\mu\text{L}$  0.04 M otopine Tris HCl-a, pH 7.5, kako bi ju neutralizirali, te je nakon vorteksiranja spremljena na – 20 °C do daljnje primjene.

Iz uzoraka prašine, ukupna DNA je izdvojena primjenom komercijalnog kita Nucleo Spin DNA RapidLyse (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) prema uputama proizvođača. Ukratko, u epruvetu od 2 ml izvagano je 40 mg uzorka prašine na koju je dodano 150  $\mu\text{L}$  RLY otopine za lizu i 10  $\mu\text{L}$  proteinaze K. Nakon inkubacije na 56 °C kroz jedan sat uz povremeno vorteksiranje, dodano je 440  $\mu\text{L}$  RLB otopine za vezanje te je tekući sadržaj uliven u kolonicu. Kolonica je potom centrifugirana na 11000 okretaja kroz jednu minutu i potom prebačena u novu sakupljačicu, a centrifugirani sadržaj je bačen zajedno sa sakupljačicom. Potom je kolonica dva puta isprana s RLW medijem centrifugiranjem na 11000 okretaja jednu minutu, te jednim centrifugiranjem osušena na istoj brzini i isto vrijeme bez dodatka medija. Ukupna DNA je eluirana s kolonice dodatkom 100  $\mu\text{L}$  RLE medija i inkubacijom kroz 5 minuta, a potom centrifugiranjem na 11000 okretaja kroz jednu minutu.

### 3.3. QPCR REAKCIJA

Svaki uzorak DNA analiziran je qPCR reakcijom za dokaz cjepnog soja CVI988 i divljeg soja VMB-a, primjenom početnica (Tablica 1.) specifičnih za odsječak pp38 gena (Gimeno i sur., 2014.). Za svaki uzorak qPCR reakcija je provedena u ukupnom volumenu od 15  $\mu$ L u duplikatu uz dodatak 3  $\mu$ L izolirane DNA. U reakciju je dodano 0.45  $\mu$ L svake početnice, 7.5  $\mu$ L kita Go Taq qPCR Master Mix (Promega, Madison, SAD), 0.05  $\mu$ L Rox Reference Dye (TaKaRa, Shiga, Japan) i 3.45  $\mu$ L ultračiste vode.

Tablica 1. Početnice za qPCR reakciju specifične za pp38 gen VMB-a (Gimeno i sur., 2014.)

POČETNICA	SEKVENCA
F-VMB	5'-GAGGGAGAGTGGCTGTCAA-3'
F-CVI988	5'-GAGGGAGAGTGGCTGTCAAG-3'
R	5'-TCCGCATATGTTCTCCTTC-3'

qPCR reakcija je analizirana primjenom uređaja Mx3005P (Stratagene, SAD) uz termalni profil: denaturacija na 95 °C kroz 10 min, potom 50 ciklusa denaturacije na 95 °C tijekom 30 sekundi, vezanje početnica na 60 °C tijekom 1 minute i elongacije lanca na 72 °C tijekom 1 minute uz očitavanje fluorescencije na kraju ciklusa. Nakon umnažanja provedena je analiza produkta izradom disocijacijske krivulje, postupnim zagrijavanjem reakcije od 55 do 95 °C uz istovremeno očitavanje fluorescencije, kako bi se utvrdila specifičnost produkta sukladno pozitivnoj kontroli.

### 3.4. STATISTIČKA ANALIZA

Dobiveni rezultati prevalencije pojedinih sojeva u uzorcima pera analizirani su korištenjem računalnog programa Statistica 13.2.0.17. (Tibco Software Inc., SAD). Nakon analize ravnomjernosti raspodjele Kolmogorov-Smirnovljevim testom, značajnost dobivenih rezultata testirana je na razini  $p \leq 0,05$  korištenjem Kruskal-Wallis testa.

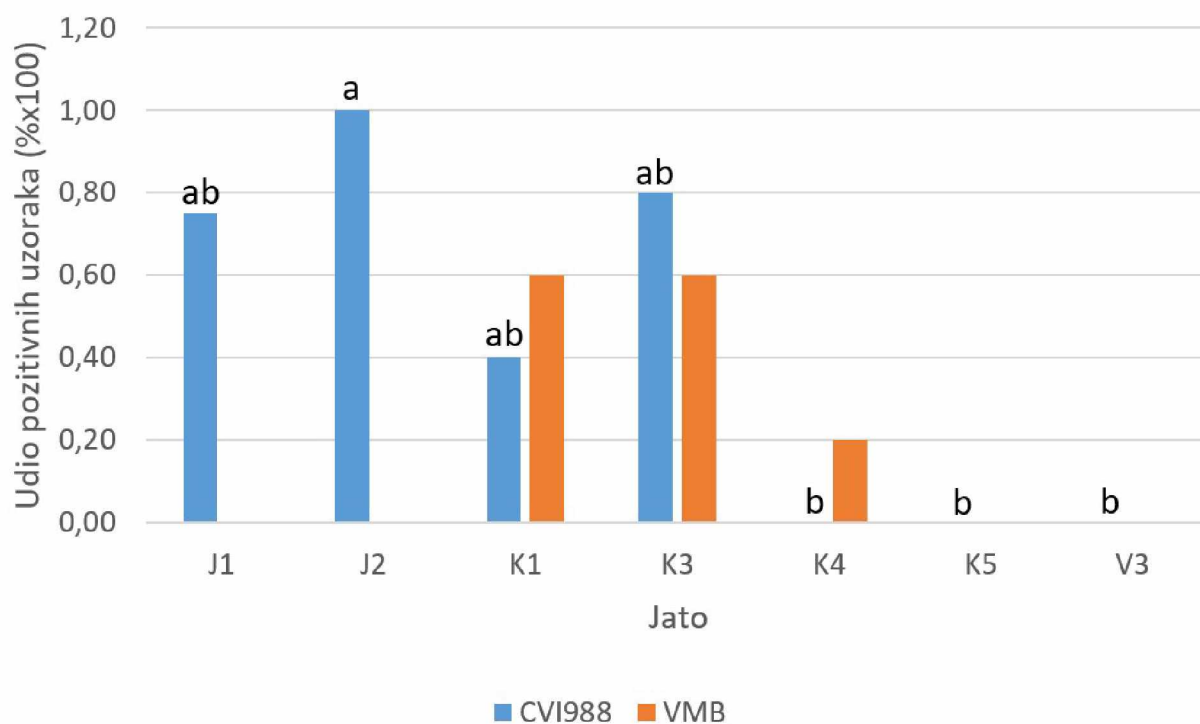
#### 4. REZULTATI

Rezultati qPCR analize pera i prašine prikazani su Tablicom 2. i Slikom 6. Uzorci analize pera pokazuju visoku učestalost dokaza soja CVI988 u uzorcima pera u mlađih jata, uz izuzetak jata K3 s farme 2 (Tablica 2). S druge strane, VMB nije dokazan u pilića dobi 3 tjedna, ali je dokazan u starijih jata, uz izuzetak najstarijeg jata V3, dobi 70 tjedana. Uzorci prašine uzeti su samo na farmi 2 kod svih 5 jata, te pokazuju da je cjepni virus CVI988 dokazan u najmlađeg jata K1 dobi 17 tjedana, te jata K3 dobi 66 tjedana. Divlji soj VMB-a dokazan je u svih jata osim najstarijeg jata V3.

Tablica 2. Rezultati dokaza cjepnog soja CVI988 i divljeg soja VMB u uzorcima pera i prašine po jatima.

MATERIJAL	PERA							PRAŠINA					
	JATO/DOB (TJ)	1J1/3	1J2/3	2K1/17	2K3/66	2K4/49	2K5/66	2V3/70	2K1	2K3	2K4	2K5	2V3
REZULTATI qPCR	9/12	10/10	2/5	4/5	0/5	0/5	0/5						
PRETRAGE (CVI988/VMB)	/	/	8	/	8	/	/	++	++	-/+	-/+	-/-	-/-
	0/12	0/10	/	3/5	/	0/5	0/5						
	VMB	VMB	3/5	VMB	1/5	VMB	VMB						
			VMB		VMB								

Po udjelu pozitivnih uzoraka na cjepni soj CVI988 za uzorke pera iz svih uzorkovanih jata, može se vidjeti da je najveća učestalost dokazivanja u pilića dobi 3 tjedna, i u mlađim jatima, i kreće se od 40 do 100 %, izuzev starijeg jata K3, u kojeg je utvrđeno 80 % učestalosti (Slika 6). Razlike su statistički značajne između jata pilića J2 dobi 3 tjedna u kojih je učestalost 100%, i starijih jata K4, K5 i V3, kod kojih je učestalost 0%. Divlji soj VMB-a dokazan je u većem postotku u jata na početku proizvodnje i srednje dobi, dok kod pilića i starijih jata nije dokazan.



Slika 6. Udio pozitivnih uzoraka na cjepni soj CVI988 i divlji soj VMB u uzorcima pera. Statistički značajne razlike u učestalosti cjepnog soja CVI988 između jata u uzorcima pera označene su različitim malim slovima abecede (a, b).

## 5. RASPRAVA

Virus Marekove bolesti jedan je od značajnijih virusa u peradarskoj industriji. Njegova ubikvitarnost, imunosupresivnost i onkogenost predstavljaju niz važnih problema, naročito u sinergiji s drugim patogenima. Virulencija sojeva VMB pokazuje globalni trend povećanja, evoluirajući od blagog prema virulentnim, vrlo virulentnim i vrlo virulentnim plus oblicima, sinergijom cjepiva i imunosnog sustava (NAIR, 2005.). Inicijalna dijagnoza Marekove bolesti temelji se na kliničkom pregledu zaraženih kokoši, popraćenom karakterističnim postmortalnim lezijama. Prisustvo VMB-a unutar jata može se potvrditi izdvajanjem i dokazom u zaraženim tkivima. Pokusno, a sve češće i dijagnostički, vrlo je korisno istovremeno mjeriti dinamiku širenja i količinu cijepnih i divljih sojeva VMB kod pojedinačnih ptica radi boljeg razumijevanja mehanizama cijepne zaštite i razlike u učinkovitosti između cjepiva. Divlje sojeve i cjepni soj Rispens/CVI-988 karakteriziraju male genske razlike, koje omogućuju diferencijaciju, ali i praćenje aktivnosti virusa u organizmu (GIMENO i sur., 2014.). Tako je moguće odrediti da li je u organizmu prisutna aktivacija divljeg soja i postupan razvoj MB-a, ili imunosni sustav pod djelovanjem cjepnog soja uspješno drži divlji virus pod kontrolom (GIMENO i sur., 2014.). Prisustvo i količina cjepnog soja prisutna u kokoši može se specifično odrediti primjenom qPCR-a u perju komercijalnog jata (BAIGENT i sur., 2013.; GIMENO i sur., 2014.). Pokazalo se da se na taj način može uspješno pratiti cijepljenost jata, dokazom cjepnog soja, kao i epizootiološki dinamiku širenja divljeg soja u okoliš i intenzitet kontaminiranosti farmi.

U ovom radu korištenu su uzorci pera i prašine za dokaz cjepnog i divljeg soja. Uzorci su uzeti sa dviju farmi od pilića te mlađih i starijih jata kokoši u proizvodnji. Iz uzetih uzoraka ukupna DNA izdvojena je na dva načina. Jedan način je korištenjem alkalne ekstrakcije, a drugi primjenom komercijalnog kita. qPCR reakcijom je dokazan cjepni soj CVI988 i divlji soj VMB-a neovisno o načinu izdvajanja DNA.

Iz dobivenih rezultata jasno može se iščitati da je cijepni soj CVI988 dokazan u većoj količini kod pilića u dobi od tri tjedna. Taj se rezultat podudara s činjenicom da je vrhunac količine cijepnog soja u pilića između dva i tri tjedna poslije provođenja imunoprofilakse (BAIGENT i sur., 2013.). Ovo cjepivo štiti jedinke od mortaliteta, kliničkih znakova i pojavljivanja lezija, ali ne i od replikacije i izlučivanje divljeg virusa. U ovom istraživanju je divlji soj VMB-a dokazan u jatima starosti 49 i 66 tjedana. Taj rezultat ukazuje na kontakt i zaražavanje kokoši s divljim sojem VMB, budući da je ubikviratan, uz njegovo kontinuirano izlučivanje. Ono što je također vidljivo je da u

nekim od starijih jata divlji soj nije dokazan u uzorcima perja. U najstarijem jatu V3, dobi 70 tjedana, divlji soj VMB nije dokazan ni u uzorcima prašine, što moguće može upućivati na dobru zaštićenost jata. Jedini izuzetak su rezultati jata K3 koje je pokazalo visoku učestalost cjepnog soja, a jato je dobi 66 tjedana. Kako ovo jato i u visokoj dobi izlučuje i cjepni i divlji soj, oba su također prisutna i u prašini, što je utvrđeno njenom pretragom. Ako je uzorak prašine uzet s mjesta na kojem nije provedeno čišćenje kroz duži period, možda i od useljenja, za očekivati je pronaci cjepni soj u većem postotku, kao što je to i u ovom slučaju, od 80%. Cijepljenje protiv VMB uvelike smanjuje izbijanje bolesti izlučivanje divljeg soja VMB. Cijepljenje protiv MB smanjuje kliničku pojavnost bolesti i izlučivanje divljeg soja VMB-a, potičući imunosnu reakciju koja drži viremiju divljeg soja pod nadzorom. Rezultati istraživanja pokazuju da je cijepljenje sojem CVI988 najučinkovitije u odgađanju širenja divljeg soja (BAIGENT i sur., 2013.), u odnosu na serotip 2 i 3 i njihove kombinacije. Također, kinetika divljeg soja ovisi o vremenu zaražavanja u odnosu na cijepljenje, što se ono kasnije dogodi to je učinak cjepiva bolji, a količina divljeg soja VMB-a koja se izlučuje je manja (ISLAM i sur., 2014.). Moguće je da je u pojedinim starijih jata došlo do kasnijeg zaražavanja, što je omogućilo dobar imunosni odgovor na dano cjepivo, pri čemu imunosni sustav drži divlji soj VMB-a u latenciji, te se divlji soj ne može dokazati u perju i prašini.

Navedeni rezultati pokazuju da je provedeni monitoring dokazao prisustvo cjepnog soja, što je iznimno važno u mlađih kategorija dobi oko 3 tjedna, kako bi se potvrdio unos cjepiva planiranim postupkom imunoprofilakse. Odstupanja mogu ukazati na greške u čuvanju i pripremi cjepiva, aplikaciji, mogućem stresu koju su pilići izloženi nakon primjene, kao i da li je cjepivo uopće korišteno. S druge strane, dokaz divljeg soja VMB-a u perju pokazuje koliko je cjepivo učinkovito i koliki je opseg kontaminacije okoliša, dok je prašina idealan medij za praćenje provedbe čišćenja i dezinfekcije objekata i provedbe biosigurnosnih mjera u njima.



## 6. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti slijedeće:

1. Analizom uzoraka vidljiva je najveća učestalost cjepnog soja u pilića dobi 3 tjedna, što potvrđuje ulazak cjepiva u organizam i njegovu replikaciju, tj. uspješnost cijepjenja.
2. Utvrđena je statistički značajna razlika u učestalosti cjepnog soja CVI988 između jata pilića J2 u dobi 3 tjedna i starijih jata K4, K5 i V3, što potvrđuje spomenuti unos cjepiva i replikaciju u mladih životinja, ali i njegovo iščezavanje u starijih jata.
3. Divlji soj VMB dokazan je u većem postotku u jata na početku proizvodnje i jata srednje dobi, što ukazuje na njegovo prisustvo na farmi kao i na njegovu aktivnost i namnažanje u perju i izlučivanje u okoliš, što može biti posljedica njegove reaktivacije.
4. U pilića i starijih jata nema dokaza divljeg soja VMB što ukazuje da cijepjenje osigurava odgodu pojave divljeg soja u pilića, a u starijih životinja moguće potiskivanje divljeg soja i smanjenje izlučivanja i kontaminacije okoliša.

## 7. LITERATURA

1. BAIGENT, S.J., L.P. SMITH, V.K. NAIR, R.J.W. CURRIE (2006): Vaccinal control of Marek's disease: Current challenges, and future strategies to maximize protection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 78-86.
2. BAIGENT, S.J., L.P. SMITH, L.J. PETHERBRIDGE, V.K. NAIR (2011): Differential quantification of cloned CVI988 vaccine strain and virulent RB-1B strain of Marek's disease viruses in chicken tissues, using real-time PCR. *Res. Vet. Sci.* 91, 167-174.
3. BAIGENT, S.J., L.B. KGOSANA, A.A. GAMAWA, L.P. SMITH, A.F. READ, V.K. NAIR (2013): Relationship Between Levels of Very Virulent MDV in Poultry Dust and in Feather Tips from Vaccinated Chickens. *Avian Dis.* 57, 440-447.
4. BALKIZ, O. (2007): Sexing Greater Flamingo Chicks from Feather Bulb DNA. [https://www.researchgate.net/publication/230559810\\_Sexing\\_Greater\\_Flamingo\\_Chicks\\_from\\_Feather\\_Bulb\\_DNA](https://www.researchgate.net/publication/230559810_Sexing_Greater_Flamingo_Chicks_from_Feather_Bulb_DNA) (14.6.2024)
5. BARTOLOME, S. A., J. L. A. BERNAL (2020): Marek disease: monitoring of new outbreaks. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20210055510> (26.5.2024)
6. BERTZBACH, L.D., A.M. CONRADIE, Y. YOU, B.B. KAUFER (2020): Latest Insight into Marek's Disease Virus Pathogenesis and Tumorigenesis, *Cancers* 12 (647), 2-3.
7. BUMSTEAD, N., J. KAUFMAN (2004): Genetic resistance to Marek's disease. U: Marek's Disease – An Evolving Problem, T. F. Davison i V. Nair (Ur.), Academic Press, London, str. 112-123.
8. DAVISON F., P. KAISER (2004): Immunity to Marek's disease. U: Marek's Disease – An Evolving Problem, T. F. Davison i V. Nair (Ur.), London, Academic Press, str. 126-139.
9. DAVIDSON, I., A. NATOUR-ALTORY, I. RAIBSTEIN, E KIN, Y. DAHAN, H. KRISPIN, N. ELKIN (2018): Monitoring the uptake of live avian vaccines by their detection in feathers, *Vaccine* 36(5), 637-643.
10. DAVIDSON, I. (2020): Out of Sight, but Not Out of Mind: Aspects of the Avian Oncogenic Herpesvirus, Marek's Disease Virus. *Animals* 10(8), 1-8.
11. GIMENO, I. M. (2004): Future strategies for controlling Marek's disease. U: Marek's Disease – An Evolving Problem, T. F. Davison i V. Nair (Ur.), Academic Press, London, str. 186 - 198.
12. GIMENO, I.M. (2008): Marek's disease vaccines: A solution for today but a worry for tomorrow?, *Vaccine* 26S, C31–C41.

13. GIMENO, I. M., J. R. DUNN, A. L. CORTES, A. EL-GALIL EL-GOHARY, R. F. SILVA (2014): Detection and differentiation of CVI988 (Rispens vaccine) from other serotype 1 Marek's disease viruses. *Avian Dis.* 58(2), 232-243.
14. ISLAM, T., S.W. WALKDEN-BROWN, K.G. RENZ, A.F.M.F. ISLAM, S. RALAPANAWAWE, (2014): Replication kinetics and shedding of very virulent Marek's disease virus and vaccinal Rispens/CVI988 virus during single and mixed infections varying in order and interval between infections. *Vet. Microbiol.* 173, 208-223.
15. HAO, X., S. LI, J. LI, Y. YANG, A. QIN, S. SHANG (2021) An Anti-Tumor Vaccine Against Marek's Disease Virus Induces Differential Activation and Memory Response of gd T Cells and CD8 T Cells in Chickens. *Front. Immunol.* 12, 1-13.
16. MALAGO, W., JR., H. M. FRANCO, E., JR., MATHEUCCI, A.MEDAGLIA, F. HENRIQUE-SILVA (2002): Large scale sex typing of ostriches using DNA extracted from feathers. *BMC Biotechnol.* 2, 1-4.
17. NAIR, V., H. KUNG (2004): Marek's disease virus oncogenicity molecular mechanisms. U: Marek's Disease – An Evolving Problem, T. F. Davison i V. Nair (Ur.), Academic Press, London, str. 32-46.
18. NAIR, V., I. GIMENO, J. DUNN (2020): Marek's Disease, U: Diseases of Poultry, 14. izd., D. E. Swayne i sur. (Ur.), Wiley-Blackwell, Hobken, NJ, USA, str. 566-567.
19. OSTERRIEDER, K., J. F. VAUTHEROT (2004): The genome content of Marek's disease-like viruses. U: Marek's Disease – An Evolving Problem, T. F. Davison i V. Nair (Ur.), Academic Press, London, str. 17-29.
20. PASTORET, P.P. (2004): Introduction. U: Marek's Disease – An Evolving Problem, T. F. Davison i V. Nair (Ur.), Academic Press, London, str. 1-7.
21. PAYNE, L. (2004): Pathological responses to infection. U: Marek's Disease – An Evolving Problem, T. F. Davison i V. Nair (Ur.), Academic Press, London, str. 78-95.
22. RALAPANAWAWE, S., S. W. WALKDEN-BROWN, A.F.M. FAKHRUL ISLAM, K. G. RENZ (2015): Effects of Rispens CVI988 vaccination followed by challenge with Marek's disease viruses of differing virulence on the replication kinetics and shedding of the vaccine and challenge viruses. *Vet. Microbiol.* 183, 21–29.
23. ROSALLES, A.G. (2018): Marek's disease control in broiler breeds. The Poultry Site, <https://www.theooultrysite.com/articles/mareks-disease-control-in-broiler-breeds>
24. TILLEY, S., D.D. FRAME, M.C. BLAND (2013.): Marek's Disease, Utah State University, [www.extensions.usu.edu](http://www.extensions.usu.edu)

25. TULI, N.F., W.O. FAYAISA (2023): Review on Virulence and Diagnostic Methods of Marek's Disease Virus in Chickens. *J. Inter. Med. Res. & Rep.* 2, 1-7.
26. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (2023): Marek's Disease, [https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/3.03.13\\_MAREK\\_DIS.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.03.13_MAREK_DIS.pdf) (30.5.2024)
27. ZELNÍK, V. (2004): Diagnosis of Marek's disease. U: Marek's Disease – An Evolving Problem, T. F. Davison i V. Nair (Ur.), Academic Press, London, str. 156-165.

## 8. SAŽETAK

Helena Leskovar

Monitoring prevalencije divljih i cijepnih sojeva virusa Marekove bolesti pretragom pera i prašine qPCR postupkom na farmama kokoši nesilica

Onkogeni virus iz porodice *Herpesviridae* uzročnik je Marekove bolesti, koja je karakterizirana nastankom limfoidnih neoplastičnih promjena, imunosupresijom i prolaznom paralizom kokoši. Marekova bolest ima značajan ekonomski utjecaj zbog visokog mortaliteta i morbiditeta, iako ne pokazuje zoonotski potencijal. Međutim, visoki gubici, posebice zbog organoleptičkih promjena, predstavljaju veliki problem u peradarskoj industriji. Virus Marekove bolesti je ubikvitaran i širi se horizontalnim putem. Zbog sve učestalijeg povećanja virulencije VMB-i potrebna je učinkovita strategija za kontrolu. U svrhu kontrole koristi se imunoprofilaksa, pri čemu je zlatni standard cijepljenje CVI988 sojem. Ovo cjepivo pokazuje zaštitu protiv vrlo virulentnih sojeva i najčešće se primjenjuje kod jednodnevnih pilića. Sva cjepiva mogu štiti od mortaliteta, kliničkih znakova i učestalosti pojavljivanja lezija, ali nijedno ne pruža potpunu zaštitu od infekcije, replikacije i izlučivanja divljeg virusa. Za bolje razumijevanje mehanizama cjepne zaštite korisno je pratiti cjepne i divlje sojeve VMB-a. U tu svrhu moguće je koristiti qPCR test na uzorcima perja i prašine. U ovom radu istraživana je prisutnost cjepnih i divljih sojeva VMB-i na uzorcima perja i prašine s dvije farme, ukupno iz sedam jata. Cjepni soj CVI988 bio je u značajno višem postotku dokazan u jatima pilića dobi tri tjedna no u starijih jata, gdje je njihov dokaz izostao. Divlji soj VMB-a bio je prisutan u većem postotku u jatima na početku proizvodnje i srednje dobi, dok kod pilića i starijih jata nije dokazano njegovo prisustvo. Izuzetak je bilo starije jato K3, u kojem je zabilježena veća učestalost cjepnog soja. Rezultati ukazuju na važnost praćenja sojeva VMB-a s ciljem praćenja provedene imunoprofilakse te širenja i kontaminacije okoliša divljim sojevima.

Ključne riječi: Marekova bolest, cijepljenje, qPCR, monitoring, cijepni soj, divlji soj

## 9. SUMMARY

Helena Leskovaar

Monitoring the prevalence of wild and vaccine strains of Marek's disease virus by qPCR testing of feathers and dust on layer farms

The oncogenic virus from the *Herpesviridae* family is the causative agent of Marek's disease, which is characterized by the formation of lymphoid neoplastic changes, immunosuppression and transient paralysis in chickens. Marek's disease has a significant economic impact due to high mortality and morbidity, although it does not exhibit zoonotic potential. However, high losses, due to organoleptic changes, represent a major problem in the poultry industry. The Marek's disease virus is ubiquitous and spreads horizontally. Due to the increasing virulence of MDV, an effective strategy for control is needed. For control, immunoprophylaxis is used, with the vaccination using CVI988 strain as the golden standard. This vaccine provides protection against very virulent strains and is most commonly administered to day-old chicks. All vaccines could protect against mortality, clinical signs, and the frequency of lesion occurrence, but none provide complete protection from infection, replication, and shedding of the wild virus. For a better understanding of the mechanisms of vaccine protection, it is useful to monitor vaccine and wild strains of MDV. For this purpose, qPCR testing could be used on feather and dust samples. This study investigated the presence of vaccine and wild strains of MDV in feather and dust samples from two farms, on seven flocks in total. The CVI988 vaccine strain was in significantly higher percentage detected in chicken flocks up to three weeks, compared to older flocks, in which detection was absent. The wild MDV strain was present in a higher percentage in flocks at the start of production and of intermediate age, while it was not detected in chicks and older flocks. The exception was flock K3, where a higher prevalence of the vaccine strain was recorded. Results emphasise the importance of MDV strain monitoring with the aim of monitoring immunoprotection and spread and environmental contamination with wild strains.

Key words: Marek's disease, vaccination, qPCR, monitoring, vaccine strain, wild strain

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 24. prosinca 1997. godine u Zagrebu. Pohađala sam osnovnu školu nakon koje sam upisala Opću gimnaziju Lucijana Vranjanina. 2016. godine upisujem Integrirani preddiplomski i diplomski studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studiranja sudjelovala sam na 1. međunarodnom znanstvenostručnom skupu o gmazovima i egzotičnim životinjama "REPTILIA" 2018. godine, na radionici Afrička svinjska kuga u divljih svinja - osnove i mjere sprečavanja 2020. godine. Stručnu praksu sam obavila u ambulanti za male životinje "Veterina Branimir". Od 2023. godine zaposlena sam u odijelu Osiguranja kvalitete u Plivi, Hrvatska, gdje radim kao student.