

بررسی ضایعات هیستوپاتولوژیک بیماری مارک در طیور گوشتی

کشتار شده در کشتارگاه شهرستان ارومیه

دکتر مهران نصیری^{۱*}، دکتر ایرج سهرابی حق‌دوست^۲، دکتر رجبعلی صدرخانلو^۳، دکتر علیرضا طالبی^۴

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی ضایعات هیستوپاتولوژیک بیماری مارک در جوجه های گوشتی بوده که دارای سنین پائین (۱۰-۶ هفته) بوده هر چند بر طبق بسیاری از گزارشات موجود معمولاً بروز این بیماری فاقد ضایعات هیستوپاتولوژیک مشخص در این سنین می باشد. طی این مطالعه ۱۲۶۸۷ قطعه طیور گوشتی مورد بررسی کالبدگشائی قرار گرفتند که در ۸ مورد از آنها علائم بیماری مارک، شامل ندولهای مشخص لنفوئیدی جلدی و احشائی ناشی از لنفوپرولیفراسیون بیماری مارک مشاهده گردید که جهت مطالعات میکروسکوپی ضایعات، از این تعداد نمونه برداری به عمل آمد. پس از تهیه اسلاید و رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین، این ضایعات مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند. از لحاظ ماکروسکوپی در هر ۸ مورد ندولهای لنفوئیدی در پوست مشاهده شد. در یک مورد این ندولها در طحال و در سه مورد در کبد نیز دیده شدند. در هیچیک از سایر اندامها، بورس فابریسیوس، عصب سیاتیک، ریه و چشم، علائم و ضایعات مربوط به بیماری مارک مشاهده نگردید. مطالعه اسلایدهای پاتولوژیک تهیه شده از محل ضایعات نشانگر سلولهای لنفوئیدی با تقسیمات میتوز فراوان در محل ایجاد این تومورها، سلولهای توموری پلئومورفیک تک هسته ای، وجود سلولهای موسوم به سلولهای مارک صرفاً در کبد، تهاجم این ندولها در پوست بویژه در محل اطراف فولیکول پرها و بافت همبند زیر اپیتلیوم، عدم وجود ضایعات مشخص در اعصاب، چشم و عدم وجود سلولهای مارک در ندولهای لنفوئیدی طحال بود. طی این بررسی مشخص گردید که این بیماری در سنین پائین هم قابلیت ایجاد ضایعات متعدد حائز اهمیت و نتیجتاً کاهش راندمان تولید را در این دسته از طیور پرورشی نیز بدنبال دارد.

واژگان کلیدی: مارک، پلئومورفیک، هیستوپاتولوژیک، ندولهای لنفوئیدی، لنفوپرولیفراسیون.

A histopathologic study of Marek's disease (MD) lesions in slaughtered Broilers in Urmia slaughterhouse.

Nassiry M.^{1*}, Sohrabi Haghdoust I.², Sadrkhanlou R.A.³, Talebi A.⁴

1- Graduated of Pathology, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science & Research Branch, Tehran, Iran- Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

2- Department of Pathology, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science & Research Branch, Tehran, Iran

3- Department of Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

4- Department of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

The objective of this research was to study the macroscopic and histopathologic lesions of infected Broilers with Marek's disease in 6-10 weeks, although, it has been documented that MDV infection during these weeks, usually have no important histopathologic changes. From 12687 slaughtered broilers, 8 cases showed MD changes after necropsy. There were skin lymphoid tumors in all 8 cases in 3 and spleen lesion liver and in 1 case in one. Changes were included visceral and cutaneous lymphoid tumors, containing accumulation of small and large lymphatic mononuclear cells and large amounts of pleomorphic tumor cells. No changes were found in nervous system, eye, bursa of fabricius and other organs. Results determined that MD can cause important histopathologic changes in such young broilers and makes considerable production loss.

Key words: Histopathologic, Lymphoid tumor, Marek's disease, Pleomorphic.

فارمهای سراسر دنیا، حائز اهمیت است که بدلیل بطئی و زمان بر بودن بروز ضایعات ناشی از این بیماری، تشخیص اولیه زود هنگام آلودگی به ویروس عامل، میتواند در پیشگیری از خسارت آن به شدت مؤثر واقع شود.

مقدمه

بیماری مارک (Marek's Disease) به عنوان یکی از بیماریهای مهم مداخله گر در صنعت پرورش طیور در

۱- دانش آموخته دوره دکتری تخصصی گروه پاتولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، ارومیه، ایران
۲- گروه پاتولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۳- گروه بافت شناسی و جنین شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۴- گروه بیماریهای طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

در این مناطق حتی با وجود واکسیناسیون شرایط بسیار حساس و خطرناک بود (۱). بررسیها نشان داده که شیوع این بیماری با فصل سال درارتباط بوده و در زمستان تلفات و خسارت سنگین تر می باشد که احتمالاً این موضوع بدلیل بسته شدن قسمت عمده کانالهای ورود و خروج هوا و تهویه ضعیفتر هوای سالنهای پرورش باشد.

سبب شناسی (Etiology):

عامل بیماری مارک یک هرپس ویروس (Herpesvirus) وابسته به سلول (Cell Associated) می باشد (۴) که دلایل و مدارک زیادی مبنی بر جدا سازی این ویروس از اپیتلیوم فولیکولهای پر (Feather Follicle Epithelium) جوجه های آلوده وجود دارد و انتشار این هرپس ویروس نیز از طریق FFE صورت میگیرد (۳). ایمن سازی جوجه ها بر علیه این بیماری نیز از طریق استفاده از ویروس تخفیف حدت یافته آن امکان پذیر است. دو دسته دیگر از هرپس ویروسهای غیر پاتوژن نیز از بوقلمون و جوجه جدا سازی شده که بطور نسبی در گروه MDV قرار میگیرند. به ویروسهای غیر پاتوژن جدا شده از جوجه، فرم غیر انکوژنیک (Nononcogenic) یا سروتیپ MDV₂ گفته می شود. همچنین به هرپس ویروس جدا شده از بوقلمون (Herpesvirus of Turkey) (HVT) اطلاق میگردد. با اینکه این ویروسها کاملاً از ویروس انکوژنیک MDV متمایزند، ولی برای ایمن سازی جوجه ها بر علیه MD مورد استفاده قرار میگیرند (۳). به طور کلی سه سروتیپ برای این بیماری شناسائی شده است که شامل: سروتیپ ۱ انکوژنیک بیماری مارک، سروتیپ ۲ غیرانکوژنیک بیماری مارک و سروتیپ ۳ که ویروس مارک بوقلمون یا همان HVT می باشد (۲).

مواد و روش کار

پس از انجام مراحل آماده سازی و بررسی میکروسکوپی

عامل آن یک هرپس ویروس است که باعث ایجاد ضایعات لنفوپرولیفراتیو در طیور مبتلا میگردد. معمولاً حتی پس از استفاده از واکسیناسیون نیز آلودگی در گله باعث ایجاد خسارات قابل توجهی در صنعت پرورش طیور میگردد. عموماً تشخیص بیماری مارک بر مبنای علائم کلینیکی و تغییرات پاتولوژیک صورت می گیرد، اما استفاده از روشهای اختصاصی جهت کنترل و تشخیص علائم اولیه شیوع بیماری بسیار حائز اهمیت است. در بسیاری از مطالعات بعمل آمده معمولاً ضایعات بیماری در سنین بالا گزارش شده است. تعیین دقیق زمان انکوباسیون بیماری در شرایط فارم مشکل است. در موارد غیرمترقبه در پرندگان جوان ۳-۴ هفته ای ممکن است علائم آلودگی دیده شود و معمولاً در موارد خیلی حاد پس از هفته هشتم الی نهم ممکن است علائم بیماری دیده شود. معمولاً در این موارد تعیین زمان و شرایط آلودگی بسیار مشکل است. بر اساس مطالعات انجام شده علائم کلینیکی در گله های تخم گذار معمولاً قبل از ۲۰-۱۶ هفتگی مشاهده نمیشود و بطور میانگین بین ۳۰-۲۴ هفتگی قابل مشاهده خواهد بود (۶). فلجی گذرا که ندرتاً پرندگان مبتلا را درگیر میسازد بین ۱۰-۶ هفتگی رخ میدهد (۲). بر اساس بررسی بعمل آمده توسط یکی از محققین بیماری MD در تمامی کشورهای که دارای صنعت تولید و پرورش صنعتی طیور هستند، وجود دارد ولی هم اکنون بدلیل استفاده وسیع از واکسیناسیون وسایر اقدامات مدیریتی، بدلیل هراس از خسارت سنگین این بیماری، بررسی میزان شیوع و آلودگی عامل آن در نواحی و مناطق مختلف، مشکل شده است (۶). در ایالات متحده قبل از متداول شدن واکسیناسیون، شیوع این بیماری در مناطق مختلف جغرافیائی غالباً بصورت حاد بوده و علائم متغیری را از خود نشان میداد. در این میان بیشترین خسارات در مناطقی که پرورش طیور در آن نواحی به صورت سنتی انجام می گرفت، دیده می شد و

آزمون PCR نیز بعمل آمد).

نتایج

در بررسی تمامی موارد اثری از ضایعات التهابی یکطرفه یا دوطرفه در عصب سیاتیک دیده نشد. در هیچکدام از پرندگان آلوده مواردی از کدورت قرنیه و فرم چشمی بیماری دیده نشد. بافت کلیه در تمامی موارد مورد بررسی قرار گرفت که در هیچکدام اثری از ضایعات پاتولوژیک دیده نشد. ریه پرندگان مبتلا کاملاً سالم و فاقد هر گونه علائم پاتولوژیک (چه میکروسکوپی و چه ماکروسکوپی) بود. در محوطه پریتون بوس و سایر اندامها علائم خاصی دال بر وجود ضایعات یافت نشد.

نتایج بدست آمده از بررسی ماکروپاتولوژیک در جدول ۱ مشاهده میگردد.

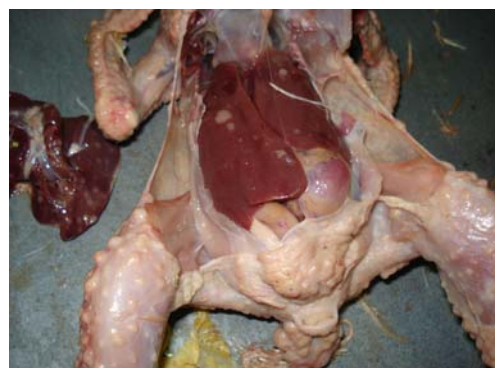
نمونه ها از ضایعات نمونه برداری شده موارد زیر ثبت گردید که به تفکیک به قرار زیر است: در هر هشت نمونه های مثبت بررسی شده علائم جلدی مارک وجود داشت که در دو مورد در تمامی قسمت های ران، گردن سینه و پشت پرندۀ این ضایعات دیده شد. علاوه بر دو نمونه قبلی، یک نمونه دیگر علائم درگیری بصورت ندولهای سفید رنگ روی کبد پرندۀ مشاهده گردید که در دو پرندۀ این ندولها با اندازه تقریبی ۲-۱ میلیمتر و درمورد سوم به تعداد کمتر با ابعاد ۷-۵ میلیمتر دیده شدند (نگاره ۱). در یک نمونه بجز علائم جلدی ندولهای چند کانونی (Multi-focal) بر روی طحال پرندۀ وجود داشت که نمونه برداری انجام گرفت ولی بدلیل اینکه بافت طحال در حالت طبیعی دارای ندولهای لنفی بنام پولپ سفید هستند تشخیص این ندولها با دشواری روبرو گردید (برای بررسی مثبت بودن این نمونه

جدول ۱- نتایج حاصل از بررسی ماکروپاتولوژیک

تعداد نمونه	بافت های مورد مطالعه	پوست	کبد	طحال	ریه	عصب سیاتیک	چشم	بوس فابریسیوس	سایر اندامها
۱	+	+	+	-	-	-	-	-	-
۲	+	+	-	-	-	-	-	-	-
۳	+	+	+	-	-	-	-	-	-
۴	+	+	+	+	-	-	-	-	-
۵	+	+	-	-	-	-	-	-	-
۶	+	+	-	-	-	-	-	-	-
۷	+	+	-	-	-	-	-	-	-
۸	+	+	-	-	-	-	-	-	-
جمع	۸	۳	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰



نگاره ۲- ندولهای مارک بر روی کبد سایر پرندگان آلوده



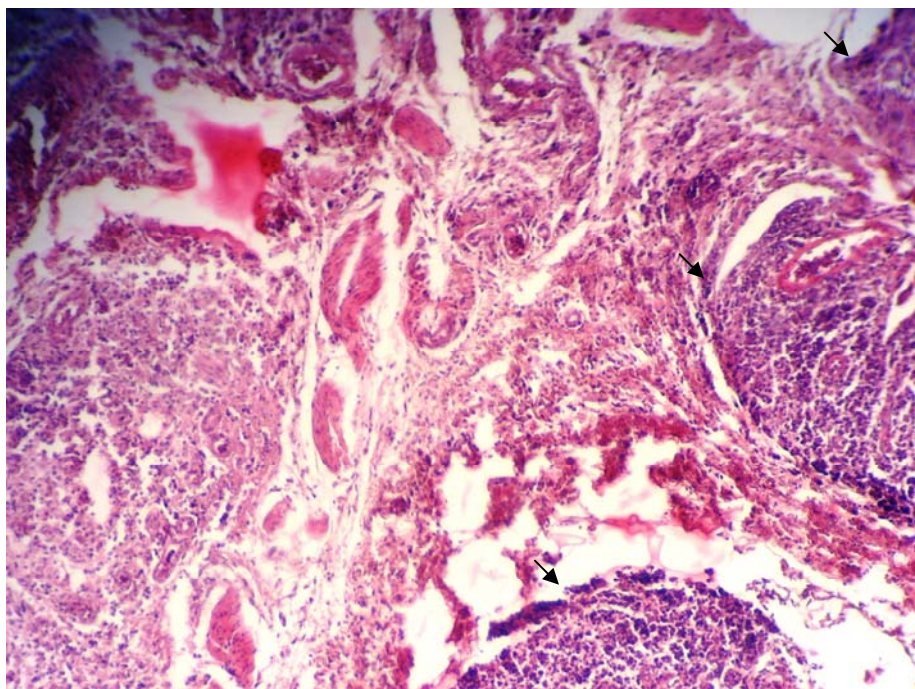
نگاره ۱- ندولهای احشایی بیماری مارک بر روی پوست و کبد یک پرندۀ آلوده

نتایج میکروسکوپی

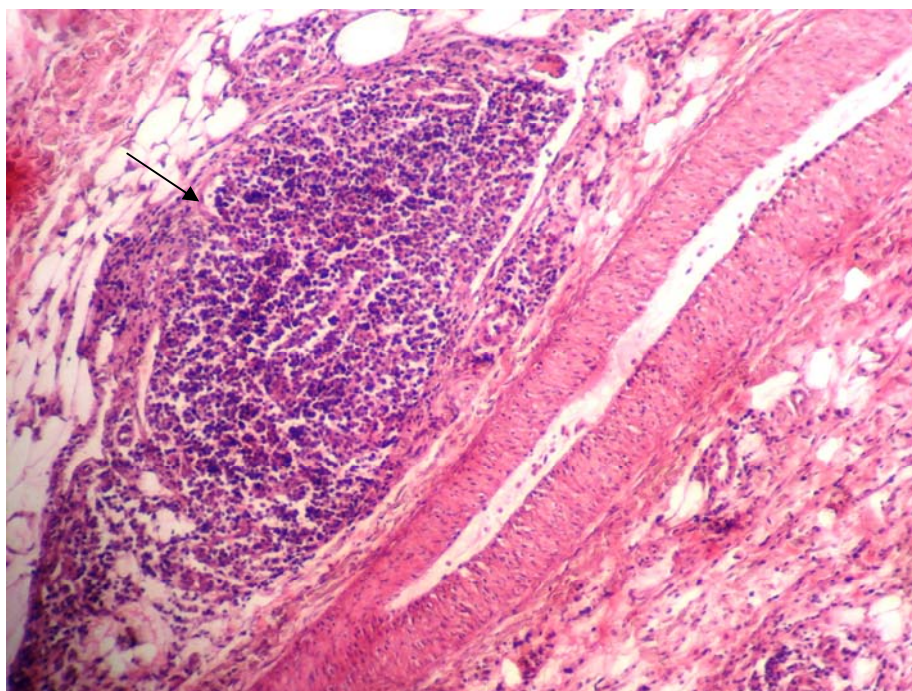
الف- پوست: تمامی موارد مورد نمونه برداری دارای کانونهای نفوذ و تجمع سلولهای تک هسته ای بصورت کانونی و گاهی منتشر در بافت ناحیه زیر اپیتلیوم و بیشتر در ناحیه بافت همبند هیپودرم بودند که در یک مورد ندولهای لنفاوی در اطراف رگ نیز دیده میشد. عمدتاً اطراف بافت چربی زیر پوست بیشترین ناحیه تجمع این سلولها بود و بر خلاف بافت کبد که تجمع این سلولها بسیار متراکم و محدودتر بود در پوست این سلولها دارای تراکم کمتر و وسعت پراکندگی بیشتر بودند. تفاوت دیگری نیز که در این قسمت دیده میشود اندازه یکنواخت سلولهای آماسی (عمدتاً لنفوسیتیک) نسبت به کبد بود که اندازه این سلولها در کبد های درگیر بشکل بسیار متغیر (از لنفوسیتهای کوچک تا لنفوسیتهای درشت) نمایان میگردد. این سلولها

هسته های با اشکال مختلف میتوزی را از خود نشان میدهند (نگاره ۳ و ۵).

نکته قابل توجه در پوست وجود تعداد کمی هتروفیل در بین ندولهای لنفوئیدی بود که عمدتاً در تمامی نمونه ها بچشم میخورد (نگاره ۶). لازم به ذکر است که در کانونهای لنفوئیدی موجود در پوست با توجه به اینکه معمولاً سلولهای مارک قابل مشاهده نیستند، ولی وجود حالات غیر معمول تقسیمات متعدد سلولی و سلولهای پلی مورف لنفوئیدی در تمامی نمونه ها همانند شکل شماره ۶ قابل مشاهده بود و همچنین برای اطمینان از مثبت بودن طیور مورد مطالعه از آزمون PCR نیز استفاده شد که نتایج حاصل از این آزمون نیز مثبت بودن نمونه ها را تأیید نمود (۵، ۷ و ۸).



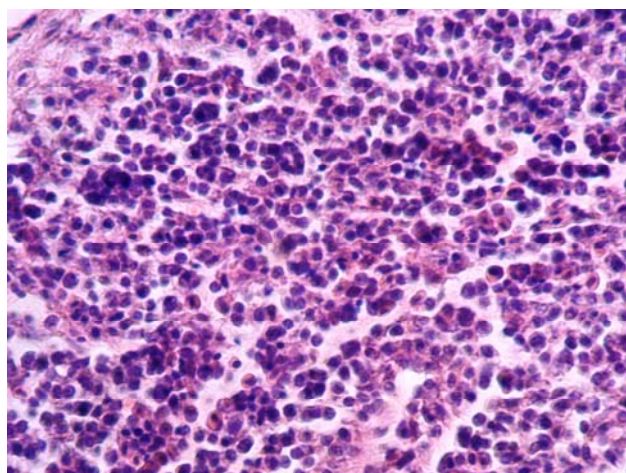
نگاره ۳- ندولهای مارک چند کانونی در بافت همبند زیر جلدی (H&E-3X40)



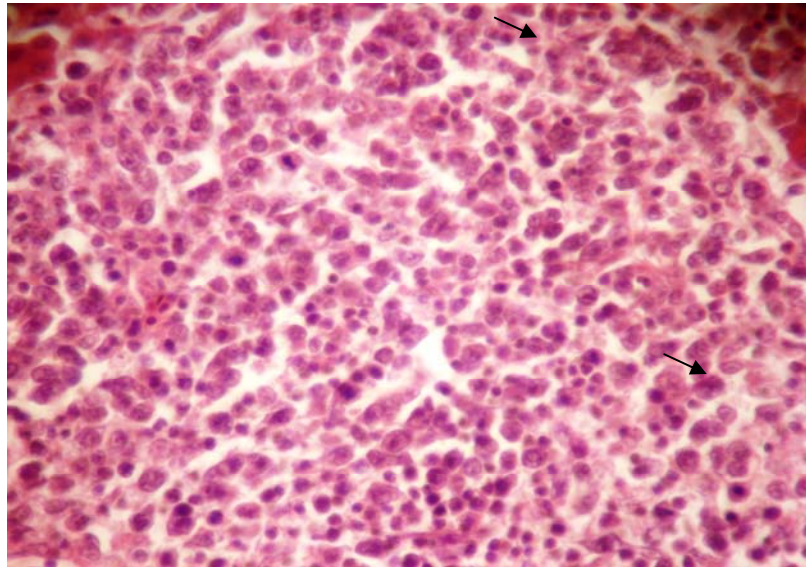
نگاره ۴- یک تومور بیماری مارک در کنار غلاف فولیکول پر در پرنده آلوده (H&E-3X40)

بوده و لنفوسیت‌های کوچک تا لنفوسیت‌های بزرگ در آن کانونها وجود دارند. در بین سایر سلول‌های کبدی مناطق سالم نیز سلول‌های لنفوسیتی با تراکم خیلی کم پراکنده بوده و بچشم می‌خورند. در نواحی تشکیل این کانونها سلول‌های کبدی (هپاتوسیتها) کاملاً از بین رفته و یا بصورت سلول‌های منفرد با سیتوپلاسم پر رنگتر از سایر سلولها وجود دارند (نگاره ۶).

ب- کبد: در بررسی پاتولوژیک کبد نندولهای مجتمع خاکستری رنگی در بین آسینی های کبدی وجود داشت که حاوی تعداد زیادی سلولهای آماسی از نوع لنفوپلاسموسیتیک بودند (نگاره ۲). این کانونها بصورت نامنظم با اندازه های مختلفی در نقاط مختلف کبد بصورت نامنظمی پراکنده بوده و لنفوسیت‌های موجود با تراکم بیشتری در مقایسه با پوست کنار یکدیگر جمع شده اند. نکته قابل توجه دیگر اینست که این لنفوسیتها در اندازه های مختلفی



نگاره ۵- تومور کانونی لمفوئید در پوست. به مقادیر زیاد اشکال میتوتیک و سلولهای لمفوئید در شکلها و اندازه های مختلف توجه کنید. سلولهای لمفوئید بزرگ دارای کروماتین مرز نشین و سیتوپلاسم کف آلود که سلولهای مارک نامیده می شوند در اینجا مشاهده نمی شوند. (H&E-400X3)



نگاره ۶- تومور مارک احشایی در کبد. به تعداد زیاد اشکال میتوتیک و سلولهای مارک توجه کنید. (H&E-3x400)

این تحقیق چگونگی بروز این ضایعات نیز در سنین پائین مشخص گردید که در جدول ۱ بخوبی نشان داده شده است. انجام این مطالعه در رابطه با مشاهدات علمی مسئله و بررسیهای ماکروسکوپی و میکروسکوپی قضیه جزئیات کامل مورد بررسی قرار گرفت، اما بر اساس نتایج حاصله توجه به نکات زیرحائز اهمیت میباشد:

- بیماری مارک در جوجه های گوشتی بین ۱۰-۶ هفته نیز میتواند ضایعات هیستوپاتولوژیک مهم ایجاد نماید که این ضایعات باعث افت تولید در جوجه های مبتلا میگردد.

- نتیجه مهم دیگر اینکه به دلیل مشاهده علایم هیستوپاتولوژیک این بیماری در منطقه در سنین پائین طبق گزارشات علمی موجود احتمالاً عامل ویروسی آلوده کننده در منطقه از دسته ویروسهای با حدت بالا یا vvMD میباشد.

- آنچه که عموماً در بررسیهای علمی مرتبط با بیماری مارک و ضایعات هیستوپاتولوژیک این بیماری در مقالات متعدد درج شده مشاهده بسیاری از این ضایعات در گله های گوشتی صنعتی ممکن نیست و زمان ظهور این ضایعات عمدتاً با یکدیگرمتمفاوت است. آنچه که با توجه به نتایج مطالعه ماکروپاتولوژیک بدست آمده حاکی از اینست که

ج- طحال: در لامهای تهیه شده از طحال با اینکه ضایعات بصورت ماکروسکوپی در سطح این اندام قبل از نمونه برداری قابل مشاهده بودند ولی بدلیل اینکه در حالت طبیعی نیز طحال دارای پولپ سفید متشکل از سلولهای لنفوسیتیک میباشد، لذا تفکیک قسمت‌های دچار ضایعه بسیار مشکل مینمود و از طرفی با توجه به اینکه وجود لنفوسیت‌های در اندازه های مختلف برخلاف کبد در کانونهای طحال نیز دیده نمیشد، لذا تشخیص میکروسکوپی را بسیار مشکل نمود. از لحاظ ساختمانی تغییر قابل ملاحظه ای در ساختار طبیعی این عضو مشاهده نمیشد. همچنین سلولهای مارک نیز در این عضو مشاهده نگردید.

بحث

همانگونه که در هدف انجام این مطالعه بیان گردید برخلاف بسیاری از گزارشات قبلی بعمل آمده در سنین پائین نیز علایم هیستوپاتولوژیک قابل ملاحظه بیماری مارک را میتوان در گله های مبتلا مشاهده نمود که تعدادی از علایم مرتبط با بیماری مارک در این سنین قابل مشاهده میباشد که این نکته میتواند بسیار ارزشمند باشد. از طرفی در طی

کمک خوبی مینمود ولی در کبد بدلیل عدم ایجاد کنتراست مناسب ارزش تشخیصی نداشت.

فهرست منابع

1. Biggs, P.M. (1967): Marek's disease. Vet. Rec. 81: 583-592.
2. Bulow, V.V. and Bigg, P.M. (1975): Precipitating antigens associated with Marek's disease viruses & a herpesvirus of turkey. Avian Pathol. 4: 147-162.
3. Calnek, B.W., Adldinger, H.K. and Kahn, D.E. (1970): Feather Follicle Epithelium: A source of enveloped & infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. Avian Dis. 14: 219-233.
4. Churchill, A.E. and Biggs, P.M. (1967): Agent of Marek's disease in tissue culture. Nature. 215: 528-530.
5. Kurt, J.H., Ole, L.N. and Poul, H.J. (2001): The use of serotype 1 & serotypy 3 specific polymerase chain reaction for the detection of marek's disease virus in chickens. Avian Pathol. 30: 243-249.
6. Purchase, H.G. (1985): Clinical disease and its economic impact. In L.N. Payne (Ed.). Marek's disease. Pp: 17-24. Martinus Nijhoff, Boston.
7. Silva, R.F. and Witter, R.L. (1996): Correlation of PCR detection of MDV with the appearance of histological lesions. In current research on marek's disease. Proceeding of 5th international symposium on marek's disease. Pp: 302-307.
8. Young, P. and Gravel, J. (1996): Rapid diagnosis of marek's disease virus in blood & other tissues using PCR. In current research on marek's disease. Proceeding of 5th international symposium on marek's disease. Pp: 308-301.

علائم پوستی این بیماری با فراوانی بیشتر و سریعتر از سایر ضایعات تظاهر می یابند و پس از آن ضایعات کبدی در مقام بعدی و طحال در رده بعد قرار دارد و هیچکدام از علائم شایع در سایر احشاء دیده نشدند که احتمالاً بروز این علائم گذشت زمان بیشتری را طلب میکند.

- ضایعات پوستی بیماری محدود به ندولهای سطحی نبوده و لایه های عمقی تری از پوست را نیز درگیر میسازد.
- در پوست طیور مبتلا عمدتاً این ندولها در نواحی اطراف فولیکولهای پر دیده شده و در بسیاری از موارد در محل ضایعه ترکیبات زرد رنگی که احتمالاً میتواند حاوی محصولات سلولهای آلوده به ویروس باشد، دیده میشود.
- ارتباط مستقیمی بین شدت ضایعات و وزن و جثه مرغان آلوده وجود داشت که هرچه شدت ضایعات شدیدتر بود وزن مرغ مبتلا نیز نسبت به طیور همسن کمتر بود.
- اطراف بافتهای چربی در بافت همبند نیز در بیشتر نمونه های پاتولوژیک تشکیل این کانونهای لنفاوی محسوس بود و در دو مورد نیز بلافاصله چسبیده به دیواره عروق خونی فولیکولهای لنفوسیتیک بزرگی بچشم میخورد.
- در کبد این کانونها متراکم تر با اندازه های متفاوت سلولی و با اشکال مختلف میتوزی در هسته دیده میشدند.
- در محل تشکیل این ندولها در کبد سلولهای هپاتوسیت محو شده بودند و در سایر قسمتهای سالم نمونه بافتی نیز لنفوسیتها بصورت پراکنده وجود داشتند.
- در قسمتهائی از پوست مبتلا به ضایعات پاتولوژیک، تعداد پراکنده ای هتروفیل نیز نمایان بود.
- در طحال با توجه به وجود پولپهای سفید تشخیص ضایعات ناممکن مینمود. از طرفی اندازه سلولهای مارک در طحال وجه تمایز خوبی برای تشخیص ضایعات بحساب نمی آید.

- رنگ آمیزی آهن - وایگرت بکار رفته جهت رنگ آمیزی برخی از نمونه ها، با توجه به رنگ آمیزی بافتهای همبند برنگ قرمز برای تشخیص ندولهای جلدی مناسب بود و