

**ПАТОМОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ У ЛІМФОЇДНІЙ ТКАНИНІ БУРСИ
ФАБРІЦІУСА КУРЕЙ, ВИКЛИКАНІ РІЗНИМИ ВАКЦИННИМИ
ТА ПОЛЬОВИМИ ШТАМАМИ ВІРУСУ ХВОРОБИ ГАМБОРО
ВИЯВЛЕНИМИ В УКРАЇНІ**

А.С. ПАСТИРЯ, аспірант кафедри вірусології,
*Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ННЦ «Інститут біології та медицини»,*
О.А. ІВАЩЕНКО, кандидат біологічних наук,
*Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ННЦ «Інститут біології та медицини»,*
О.О. НЕЧИПУРЕНКО, кандидат біологічних наук,
*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
НАН України,*
І.Г. БУДЗАНІВСЬКА, доктор біологічних наук, професор,
*Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ННЦ «Інститут біології та медицини»,*
В.П. ПОЛІЩУК, доктор біологічних наук, професор,
*Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ННЦ «Інститут біології та медицини»*
E-mail: ann.pastyria@gmail.com

Анотація. Вірус інфекційної бурсальної хвороби був вперше виявлений у провінції Гамборо США у 1962 році і з того моменту широко розповсюдився в усьому світі. Хвороба Гамборо відрізняється тяжкою імуносупресією в уражених птахів, та часто, смертністю. З 1986 року у центральній Європі з'явилися високовірулентні штами вірусу, що призводили до 70% смертності птиці. Вакцинація стала основним методом захисту від захворювання. Важливо диференціювати постінфекційний та поставкцинальний вплив вірусу на бурсу фабріціуса птахів для контролю процесу вакцинації. Тому метою роботи було виявлення впливу різних вакцинних та високовірулентних штамів вірусу на бурсу Фабріціуса курей. Для цього здійснювали гістологічне дослідження бурс вакцинованих та інфікованих птахів. Зразки відбирали із різних птахофабрик України. У результаті проведеної роботи було встановлено залежність ступеню виснаження клоакальної сумки від залишкової вірулентності вакцинних штамів а також показано тяжке виснаження бурси (до 100% лізису лімфоцитів) при інфікуванні високовірулентними штамами вірусу. Результати роботи можуть бути в подальшому використані для аналізу поствакцинальної реакції у курей під час проведення профілактичних заходів у місцях промислового вирощування птиці.

Ключові слова: вірус ІБХ, гістологічний аналіз, вакцинні штами ІБХ, високовірулентні штами ІБХ

Актуальність (Introduction). Починаючи із 1980-тих років високовірулентні штами вірусу хвороби Гамборо поширилися у центральній Європі. У 1990-тих роках ці штами було вже описано у Японії, Росії, країнах Близького Сходу, Азії, Південної Америки та Африки. Починаючи з 2000-го років у США з'явилися повідомлення про спалахи інфекції, викликані високовірулентними штамами вірусу. Окрім того випадки захворювання, викликаного вищезгаданими штамами вірусу ІБХ були зафіксовані в Україні [1].

Зважаючи на поширення високовірулентних штамів вірусу інфекційної бурсальної хвороби у світі, в тому числі й в Україні, для захисту птиці почали застосовувати масштабне вакцинування, насамперед, живими атенуйованими вакцинами. Здебільшого такі вакцини створюють застосовуючи штами із високим рівнем залишкової вірулентності [2]. Тим не менш масові вакцинації призвели до деяких негативних наслідків. Так вищезгадані вакцинні штами, розмножуючись у тканинах бурси призводили до значного виснаження фолікулів, по аналогії з високовірулентними вірусами [3]. Вплив українських ізолятів вірусу на бурсу Фабріціуса до сьогодні лишається невстановленим. Внаслідок цього постала необхідність диференціювання вакцинних та польових штамів вірусу, що були виділені у курей із птахофабрик України.

Аналіз останніх досліджень та публікацій (Analysis of recent researches and publications). Відомо, що вакцинні штами вірусу ІБХ реплікуються в лімфоїдних органах інфікованої птиці, насамперед у бурсі, викликаючи її ураження та часткову атрофію. Для захисту від захворювання використовують вакцини, що відповідно до рівня антитіл материнського походження який здатні долати поділяються на м'які, середні та середні-плюс. М'які вакцини є найменш ефективними у присутності високого рівня антитіл материнського походження. Середні та середні-плюс вакцини здатні забезпечувати кращий захист від вірулентних штамів вірусу. Середні-плюс штами вакцинні штами найбільшою мірою пошкоджують бурсу та зумовлюють імуносупресію у курчат. Такі вакцини використовують для захисту птиці від польових високовірулентних штамів вірусу [2,4]. Для диференціювання різних штамів вірусу використовують різноманітні методи, серед яких молекулярно-генетичні (ПЛР, рестрикційний аналіз, секвенування), імуноферментний аналіз та гістологічні дослідження. Останні можуть бути корисними для встановлення поствакцинальних реакцій у курей та оцінки ефективності вакцинації в господарствах. Зважаючи на велику різноманітність вакцин та широке розповсюдження польових штамів вірусу ІБХ важливою є діагностика впливу різних штамів на ключовий орган-мішень вірусу - сумку Фабріціуса [1,5]

Мета (Purpose) – виявлення впливу різних вакцинних та високовірулентних штамів вірусу виявлених в Україні на бурсу Фабріціуса курей методом гістологічного аналізу.

Методи (Methods). У роботі були досліджені птахи із 16 господарств, 10 областей України, а саме Київської, Черкаської, Львівської, Вінницької, Волинської, Дніпропетровської, Луганської, Тернопільської, Харківської та АР Крим. В господарствах використовували вакцини різних виробників,

таких як «Полімун-ІБХ МВ/5», «Полімун-ІБХ-плюс МВ/3», «Полімун-ІБХ-лайт МВ/20» (Україна), «Хіпрагамборо-GM97» (Іспанія), «Нобіліс Гамборо 228Е» (Нідерланди). Аналіз морфолого-патологічного стану птахів, взятих для дослідження, проводили з метою виявлення і опису зовнішніх ознак захворювання. Для цього проводили розтин трупів птахів, аналіз, фіксування та фотографування патологічних змін органів та систем органів курей. За виявлення таких проявів як виснаження, набряклість та гіперемованість бурси, наявність желеподібного трансудату, крововиливів на клоакальній сумці (рис. 1) та, інколи, у м'язах, збільшенні розмірів нирок та селезінки проводили відбір патологічного матеріалу для подальших гістологічних досліджень. Для гістологічного дослідження відбирали зразки бурс без ознак автолізу, що не підлягали замороженню. Органи з видимими патологічними змінами тканин відбирали на межі з нормальними частинами, щоб були захоплені здорові і змінені ділянки. Розмір зразків бурс становив 2-4 см. Відібрані зразки одразу переносили у контейнери з 10 % розчином формаліну.

Відібрані зразки тканин бурс фіксували у 10 % розчині формаліну та витримували у мікрохвильовій печі упродовж 40 секунд за потужності 400 Вт із водним навантаженням 400 мл. Після фіксації проводили первинне зневоднення тканин, занурюючи зразки у 96 % розчин етанолу, та витримували у мікрохвильовій печі протягом 10 хв за потужності 100 Вт. Після цього зразки нарізали гістологічним лезом (товщина зрізу становила 3 – 4 мм, ширина та довжина не більше 1,5 см) та поміщали у пластикові касети Turboflowe. Після фіксації здійснювали проведення досліджуваних зразків із використанням автоматизованої станції Microm STP-120. Тривалість обробки тканин та реактиви, які використовували для її проведення, наведено у таблиці 2.4. [6,7]



Рис. 1. Зображення бурси Фабріціуса: А – нормальний стан органу, Б – орган за ураження вірусом інфекційної бурсальної хвороби.

Після зневоднення та парафінізації зразків тканин, останні заливали рідким парафіном і переносили на кріоконсоль на 30 - 40 хвилин для застигання парафіну. На наступному етапі виготовляли мікротонкі зрізи патологічного матеріалу залитого у парафін. Попередню прирізку виконували встановлюючи «крок» мікротому 50 мкм, а для виготовлення зразків тканин органів – 5 мкм, кут нахилу предметного столика 10°. Готові зрізи переносили безпосередньо на предметні скельця [6,7].

1. Характеристика і тривалість етапів попередньої обробки зразків бурс у автоматизованій станції STP-120

Етапи занурення патматеріалу у	Характеристика етапу	Тривалість етапу, години
1	50 % етанол	2
2	70 % етанол	2
3	96 % етанол	3
4	96 % етанол	3
5	ксилол	3
6	кслиол	2
7	рідкий парафін	2

Гістологічні зрізи висушували упродовж 3 – 4 годин за температури + 42 °С, після чого фарбували розчинами еозину та гематоксиліну. Для цього зрізи послідовно занурювали на 5 хвилин у розчини ксилолу (99,85 %), етанолу (96 %), етанолу (70 %) та дистильовану воду, а потім фарбували розчином гематоксиліну. Після витримування у розчині барвника упродовж 1 хв препарати відмивали протягом 3 хв у воді й дофарбовували розчином еозину та знову відмивали барвник водою протягом 3 хв. Потім зрізи витримували протягом 3 хв у етанолі 70 і 96 % та ксилолі. Після висушування отримані препарати заключали у Mounting Medium Glue.

Мікроскопію зразків здійснювали із застосуванням світлового мікроскопу Ахіоскор 2 plus за збільшення у 100, 200 та 400 разів. Зразки фотографували за чотирьохсоткратного оптичного збільшення. Одержані цифрові фотографії маркували, аналізували і описували виявлені гістологічні зміни.

Результати (Results). Для встановлення характерних паталого-морфологічних змін в бурсі здійснювали мікроскопію отриманих зразків та визначали ступінь виснаження фолікул клоакальної сумки птахів.

Ступінь виснаження фолікул бурс птиці, інфікованої високовірулентними штамами вірусу хвороби Гамборо варіював від 90 до 100 % (рис. 2). Окрім виснаження фолікул бурси, у всіх зразках також виявляли множинні крововиливи у міжфолікулярній стромі та точкові крововиливи у фолікулах фабріцієвої сумки. Також було виявлено лімфоцитарні інфільтрати у міжфолікулярній стромі.

За 100% виснаження фолікул бурс спостерігали повну відсутність В-лімфоцитів у фолікулах клоакальної сумки (рис. 2).

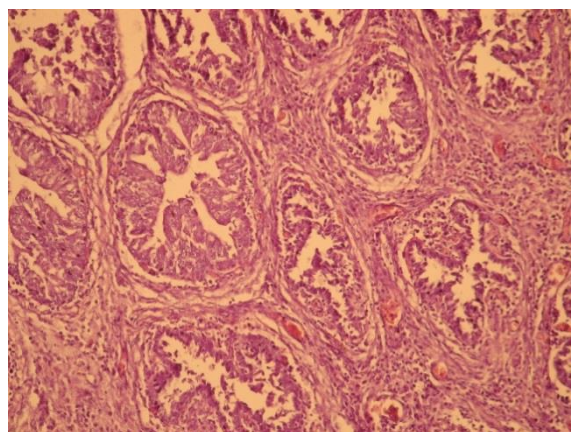
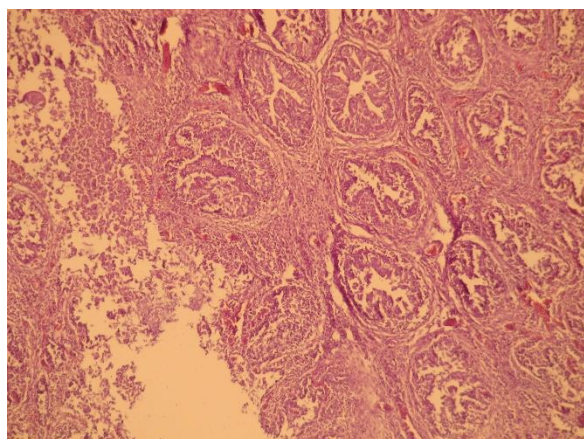


Рис. 2. Виснаження фолікул бурс птахів на 100%, викликані польовими штамми вірусу, крововиливи та інфільтрати у міжфолікулярній стромі (А – збільшення в 100 разів, В – збільшенн в 400 разів).

Результати проведених нами гістологічних досліджень збігаються із даними інших авторів [4]. При дослідженні різних штамів вірусу хвороби Гамборо, поширених у США, авторами було показано, що за інфікування високовірулентними штамми характерним є значне (до 100 %) виснаження фолікулів бурс птахів та характерні крововиливи у міжфолікулярній стромі. [4]

З метою визначення патологічних змін, викликаних у тканинах бурси за інфікування високовірулентними штамми вірусу ІБХ, було проаналізовано характерні зміни, викликані вакцинними штамми.

При вакцинуванні птахів за допомогою вакцин на основі м'яких штамів, таких як GM97, 228E та MB/20 спостерігали ступінь виснаження фолікул бурс, що складав 40 – 50 % (рис. 3). Слід наголосити, що в фолікулах та міжфолікулярній стромі бурс ми не виявили крововиливів та лімфоцитарних інфільтратів, на відміну від бурс птиці, інфікованої високовірулентними штамми. Подібні результати були отримані Murmi та співавторами [8] при дослідженні впливу штаму GM97 на тканини бурси вакцинованих курей.

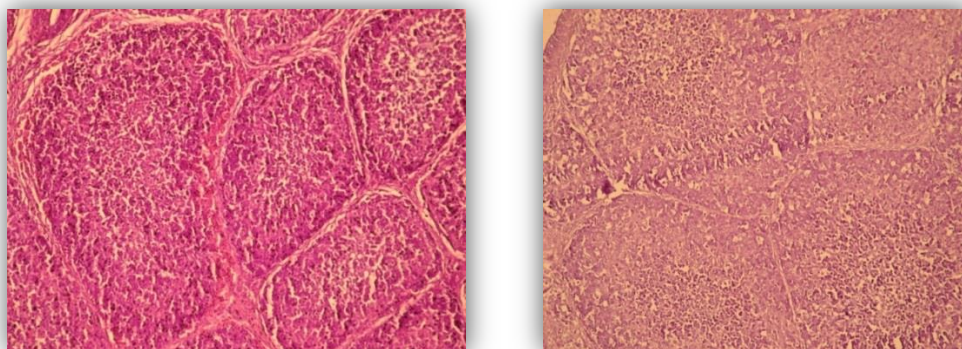


Рис. 3. Вплив м'яких (А) та середніх (Б) вакцинних штамів вірусу ІБХ на фолікули бурси (виснаження 40 %): збільшення у 400 разів.

На відміну від м'яких штамів, для середніх вакцинних штамів (V877, MB/5) було показано вищий ступінь виснаження фолікул бурс, який становив від 60 до 70 % (рис. 3). У міжфолікулярній стромі бурс також не було виявлено лімфоцитарних інфільтратів, на відміну від бурс птиці, інфікованої високовірулентним штамом.

Середні плюс вакцинні штами (MB та MB/3) спричиняють найтяжче серед вакцинних штамів виснаження бурси. Рівень виснаження при цьому складає 80 %, а інколи досягає 90 % (рис. 4). Втім відмінністю від високовірулентних штамів залишалась відсутність крововиливів у фолікулах та інфільтратів лімфоцитів у міжфолікулярній простір.

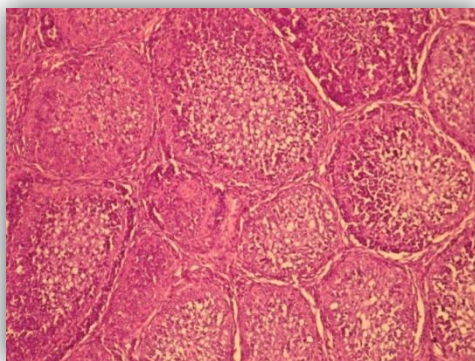


Рис. 4. Вплив середніх-плюс вакцинних штамів вірусу ІБХ на фолікули бурси (виснаження бурси 90 %): збільшення у 400 разів.

Висновки і перспективи (Discussion). Таким чином у результаті гістологічного дослідження було показано, що вакцинні штамі із різним рівнем залишкової вірулентності викликали відмінні ступені виснаження бурси птахів. Так для м'яких штамів виснаження становить 40 – 50 %, середніх – 60 – 70 %, а для середніх плюс воно складає 80 – 90 %. Було також показано, що польові високовірулентні штами, виявлені в Україні, подібно до штамів охарактеризованих в інших країнах, можуть спричинювати значне виснаження бурс, рівень якого становив від 90 до 100 %. Окрім того на відміну від усіх вакцинних штамів, за інфікування високовірулентними вірусами спостерігали значні крововиливи у фолікулах та міжфолікулярному просторі, а також лімфоцитарні інфільтрати у міжфолікулярному просторі. Таки чином згадані зміни були специфічними для ураження польовими високовірулентними штамами вірусу хвороби Гамборо. Отримані нами результати можуть бути використані для аналізу посвакцинальної реакції при проведенні профілактичних заходів на птахофабриках та диференціювання впливу вакцинних та польових штамів вірусу ІБХ.

References

- 1.Berg, T. P. (2000). Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathology*, 29 (1),175–194.
- 2.Muller, H., Mundt, E., Eterradossi, N. and Islam, M.R. (2012). Current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian Pathol.*, 41(1), 133–139.
- 3.Igwe, A.O., Nwachukwu, O.J., Chinyere C.N., Shittu, I. (2017). Evaluation of pathological changes of natural infectious bursal disease virus infection in the lymphoid organs of Black Harco pullets. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, 15 (2), 18–28.
- 4.Jackwood, D.J., Saif, Y.M., Moorhead, P.D. (1985). Immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus serotypes I and II in chickens. *Avian Dis.* 29 (4), 1184–1194.
- 5.Singh, J., Banga H. S., Brar, R. S., Singh, N. D., Sodhi, S., Leishangthem, G. D. (2015). Histopathological and immunohistochemical diagnosis of infectious bursal disease in poultry birds. *Veterinary World*, 8 (11), 1331–1339.
- 6.Goralskii, L.P., Homych, V.T., Kononskii, O.I. (2005). Osnovi gistologichnoi tehniki u normi ta pry patologii [Fundamentals of histological technique in norm and at pathology]. *Zhitomyr. Polissia*, 288.

7.Silva, M.S., Rissi, D.R., Swayne, D.E. (2016). Very virulent infectious bursal disease virus produces more severe disease and lesions in specific – pathogen free (SPF) leghorns than in SPF broiler chickens. Avian Diseases, 60 (1), 63–66.

8.Murmu, R., Islam, M.N., Most Juli, S.B., Khan, M.A.S., Harun-ur-Rashid, S.M., Hossain, F.M.A. and Rahman, M.M. (2014). Pathogenicity and immunosuppressive properties of GM-97 strain of infectious bursal disease virus in commercial broiler chickens J. Adv. Vet. Anim. Res., 1(1), 1–7.

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ БУРСЫ ФАБРИЦИУСА, ВЫЗВАННЫЕ РАЗНЫМИ ВАКЦИННЫМИ И ПОЛЕВЫМИ ШТАММАМИ ВИРУСА БОЛЕЗНИ ГАМБОРО, ВЫЯВЛЕННЫМИ В УКРАИНЕ

**А. С. Пастыря О. А. Иващенко, А. А. Нечипуренко, И. Г. Будзанивская, В.
П. Полищук**

Аннотация. Вирус инфекционной бурсальной болезни был впервые обнаружен в провинции Гамборо США в 1962 году и с того момента широко распространился по всему миру. Болезнь Гамборо отличается тяжелой иммуносупрессией в пораженных птиц, и часто, смертностью. С 1986 года в центральной Европе появились высоковирулентные штаммы вируса, которые приводили к 70% смертности птицы. Вакцинация стала основным методом защиты от заболевания. Важно дифференцировать постинфекционное и поствакцинальное влияние вируса на бурсу Фабрициуса птиц для контроля процесса вакцинации. Поэтому целью работы было определение влияния различных вакцинных и высоковирулентными штаммов вируса на бурсу Фабрициуса кур. Для этого осуществляли гистологическое исследование бурс вакцинированных и инфицированных птиц. Образцы отбирали из разных птицефабрик Украины. В результате проведенной работы была установлена зависимость степени истощения клоакальной сумки от остаточной вирулентности вакцинных штаммов, а также показано тяжелое истощение бursы (до 100% лизиса лимфоцитов) при инфицировании высоковирулентными штаммами вируса. Результаты работы могут быть в дальнейшем использованы для анализа поствакцинальной реакции у кур при проведении профилактических мероприятий в местах промышленного выращивания птицы.

Ключевые слова: вирус ИББ, гистологический анализ, вакцинные штаммы ИББ, высоковирулентные штаммы ИББ.

PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES IN LYMPHOID TISSUE OF BURSA FABTICIUS CAUSED BY DIFFERENT VACCINE AND FIELD STRAINS OF GUMBORO DISEASE VIRUS DETECTED IN UKRAINE

**A. P. Pastyria, O. A. Ivashchenko, O. O. Nechypurenko,
I. G. Budzanivska, V. P. Polischuk**

Abstract. The infectious bursal disease virus was detected in the Gumboro province of the United States in 1962 and since then has become

widespread throughout the world. Gumboro disease is characterized by severe immunosuppression in affected birds, and often mortality. Since 1986, very virulent strains of IBDV appeared in central Europe, and caused up to 70% mortality of chickens. Vaccination became the main method of protection against the disease. It is important to differentiate the post-infectious and post-vaccination effects of the virus on the bursa of the Fabricius of birds to control the vaccination process. Therefore, the aim of the study was to detect the effects of various vaccine and very virulent IBDV strains on the bursa of Fabricius of chickens. For this purpose, histological examination of bursas of vaccinated and infected birds was carried out. Samples were taken from different poultry farms in Ukraine. In results of the study we observed positive correlation between degree of depletion of the cloacal bursa and the residual virulence of the vaccine strains. Also, we detected very severe (up to 100%) depletion of bursa follicles caused by very virulent strains. The results of the work can be further used for the analysis of the post-vaccination reaction in chickens during preventive measures in places of industrial bird production.

Key words: IBDV, histological analysis, vaccine strains of IBDV, very virulent strains of IBDV.