

ВЕТЕРИНАРНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 636.5:611.4:615.371

**МОРФОЛОГИЯ ОРГАНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ЦЫПЛЯТ,
ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ВИРУС-ВАКЦИНОЙ
ИЗ ШТАММА «ИК-4»****И. Н. ГРОМОВ, Е. С. КОРНЮШИНА***УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Беларусь, 210026***А. С. АЛИЕВ***ООО «Биовет-К», г. Москва, Российская Федерация, 109382***М. В. БУРЛАКОВ, Н. Ф. ГАДЖИГУСЕЕВА***ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, 196084**(Поступила в редакцию 24.04.2018)*

Инфекционная анемия цыплят (ИАЦ) – контагиозная вирусная болезнь, которая характеризуется поражением кроветворной системы и сопровождается апластической анемией, выраженной иммуносупрессией, подкожными и внутримышечными кровоизлияниями. Болезнь регистрируется не только в специализированных крупных предприятиях, но и в частных подворьях и мелких товарных хозяйствах, о чем свидетельствует высокий уровень серопозитивной птицы. Результаты серологических исследований свидетельствуют о широком распространении вируса инфекционной анемии цыплят в птицеводческих хозяйствах Российской Федерации, Украины и Республики Беларусь. В крупных птицеводческих хозяйствах промышленного типа инфекционная анемия наносит значительный экономический ущерб.

В работе изучены морфологические изменения в органах иммунной системы цыплят при иммунизации против инфекционной анемии цыплят (ИАЦ) вирус-вакциной из штамма «ИК-4». Они характеризуются гиперплазией клеток лимфоидного ряда в красном костном мозге и тимусе, расширением корковой зоны лимфоидных узлов фабрициевой бурсы, лимфатизацией селезенки, усилением бласттрансформации лимфоцитов и плазмоцитарной реакции, формированием узелковой лимфоидной ткани в ткани на месте введения вакцины. Также установлено, что штамм «ИК-4» вируса ИАЦ, накопленный в клеточной культуре MDCC-MSB1, не обладает остаточными онкогенными свойствами.

Ключевые слова: *вакцинация, инфекционная анемия цыплят, гистологические изменения, иммунитет, тимус, костный мозг, селезенка.*

Infectious anemia of chicks (IAC) is a contagious viral disease that is characterized by damage to the hematopoietic system and is accompanied by aplastic anemia, manifested by immuno-suppression, subcutaneous and intramuscular hemorrhages. The disease is registered not only in specialized large enterprises, but also in private farmsteads and small commodity farms, as evidenced by the high level of seropositive birds. The results of serological studies indicate a wide spread of the virus of infectious anemia of chicks in poultry farms of the Russian Federation, Ukraine and the Republic of Belarus. In large poultry farms of industrial type, infectious anemia causes significant economic damage.

The article examines morphological changes in the organs of immune system of chicks during immunization against infectious anemia of chickens (IAC) with a virus vaccine from the strain "IK-4". They are characterized by hyperplasia of lymphoid cells in the red bone marrow and thymus, widening of the cortical zone of lymphoid nodules of the plantia bursa, lymphatization of the spleen, increased lymphocyte blast transformation and plasmacytic reaction, formation of nodal lymphoid tissue in the tissue at the injection site. It was also found that the strain "IK-4" of the IAC virus, accumulated in the cell culture of MDCC-MSB1, does not have residual oncogenic properties.

Key words: *vaccination, infectious anemia of chicks, histological changes, immunity, thymus, bone marrow, spleen.*

Введение

В комплексе мероприятий по профилактике и ликвидации ИАЦ основное место уделяется проведению специфической профилактики, которая предусматривает парентеральную или пероральную иммунизацию ремонтного молодняка родительских кроссов с целью создания трансвариального иммунитета у цыплят раннего возраста. Однако трудности создания активного биопрепарата против ИАЦ связаны с тем, что крайне сложно ослабить иммунодепрессивное действие вируса. До настоящего времени было разработано только 3 вакцины против ИАЦ: вакцина сухая живая «ThymovacAviPro» против ИАЦ из штамма «Сух-1» (разработчик – «ЛоманнАнималХелсГмбХ&Ко», Германия); вакцина сухая живая против ИАЦ «Нобилис САV Р4» из штамма «26Р4» (разработчик – ООО «Интервет» MSD AnimalHealth, США); вакцина сухая живая против ИАЦ «Циркомун» из штамма «Дел Рос» (разработчик – «Сева СантэАнимале», Франция). В 2017 году сотрудниками российской компании ООО «Биовет-К» (А.С. Алиев и др.) разработан экспериментальный образец новой вирус-вакцины против ИАЦ из штамма «ИК-4». Вместе с тем, изготовление и применение отечественных вакцин требует обязательного их морфологического обоснования, которое позволяет определить иммунологическую эффективность и реактогенность данных препаратов, а также степень влияния вакцинных

антигенов на внутренние органы (в том числе и органы иммунной системы), а также на качество продукции птицеводства [1, 2, 3, 5, 9, 10].

Цель работы – изучение морфологических изменений в органах иммунной системы цыплят при иммунизации их против инфекционной анемии вирус-вакциной из штамма «ИК-4».

Основная часть

Исследования проводятся на 44 цыплятах яичного кросса «Хай Лайн» 60-дневного возраста, подобранных по принципу аналогов и разделенных на 2 группы, по 22 птицы в каждой. В 60-дневном возрасте (до проведения вакцинации) по 2 цыпленка из каждой группы убивали для изучения фоновых морфологических показателей.

Цыплят 1-й (опытной) группы в эти же сроки иммунизировали вирус-вакциной из штамма «ИК-4» против ИАЦ согласно временной Инструкции по ее применению, однократно, внутримышечно, в область бедра, в дозе 0,2 мл. Цыплятам 2-й группы (контроль) в 60-дневном возрасте вводили 0,2 мл стерильного изотонического (0,85 %-ного) раствора натрия хлорида, 1-кратно, внутримышечно, в область бедра. Непосредственно перед употреблением вакцину разводили в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида. Иммунизирующая доза вакцины составляла 6 lg ТЦД_{50/0,2мл}.

На 3-й, 7-й, 14-й, 21-й и 35-й дни после вакцинации по 4 цыпленка из каждой группы убивали. Для проведения гистологического исследования отбирали красный костный мозг, тимус, бурсу Фабрициуса, селезенку, пищеводную и слепкишишечные миндалины, дивертикул Меккеля. Органы тщательно отмывали от крови охлажденным физиологическим раствором, а затем фиксировали в 10%-растворе нейтрального формалина и жидкости Карнуа. Зафиксированный материал подвергали уплотнению путем заливки в парафин по общепринятой методике [4, 6, 7, 8]. Обезвоживание и парафинирование кусочков органов проводили с помощью автомата для гистологической обработки тканей «MICROM STP 120» (Германия) типа «Карусель». Для заливки кусочков и подготовки парафиновых блоков использовали автоматическую станцию «MICROM EC 350». Гистологические срезы кусочков органов, залитых в парафин, готовили на санном микротоме. Гистологические срезы окрашивали гематоксилин–эозином и по Браше. Депарафинирование и окрашивание гистосрезов проводили с использованием автоматической станции «MICROM HMS 70». Гистологическое исследование проводили с помощью светового микроскопа «Биомед-6» (Россия). Полученные данные документированы микрофотографированием с использованием цифровой системы считывания и ввода видеоизображения «ДСМ-510», а также программного обеспечения по вводу и предобработке изображения «ScorePhoto». Результаты ежедневных наблюдений за клиническим состоянием цыплят показали, что в течение опыта существенных различий в общем состоянии птицы всех групп не выявлено.

В области введения вакцины на 3-й и 7-й дни после иммунизации у птиц 1-й группы гистологически обнаруживались диффузные и очаговые скопления лимфоцитов и плазматических клеток различной степени зрелости, а также макрофагов.

На 14-й и 21-й дни эксперимента наблюдалось формирование лимфоидных узелков крупных размеров на месте диффузных скоплений лимфоидной ткани (рис. 1 а).

При гистологическом исследовании костного мозга интактных цыплят в разные сроки исследований установлено, что строма органа была образована соединительнотканью трабекулами, отходящими от эндооста кости (рис. 1 б). Также выявлялись участки хрящевой ткани в метафизарной области. Была замечена локализация макрофагов, содержащие гранулы железосодержащих пигментов, в эндотелиальной выстилке капилляров, а также среди элементов ретикулярной ткани. В петлях ретикулярной сети располагались молодые и зрелые гемопоэтические элементы. Развивающиеся диффероны кроветворных клеток располагались островками. При этом формирование эритробластических островков часто происходило в непосредственной близости от макрофагов. В виде островков также лежали созревающие гранулоциты. Тромбобласты, протромбоциты и тромбоциты локализовались рядом с синусоидными капиллярами. Вокруг кровеносных сосудов встречались также небольшие группы лимфоцитов и моноцитов. Малодифференцированные клетки преобладали среди клеток костного мозга.

В диафизах трубчатой кости выявлялся желтый костный мозг. Он состоял из ретикулярной ткани, которая местами была замещена скоплениями липоцитов. На 14-й и 21-й дни после иммунизации в костном мозге птиц опытной группы отмечена выраженная гиперплазия клеток лимфоидного ряда. При этом крупноочаговые скопления лимфоцитов различной степени зрелости визуализировались в периферической части органа непосредственно под периостом (рис. 2 а).

При микроскопическом исследовании тимуса цыплят контрольной группы установлено, что его дольки состоят из корковой зоны, расположенной на периферии, и мозговой зоны, занимающей центральную часть дольки (рис. 2 б). В связи с большим содержанием здесь лимфоцитов корковое вещество выглядело более темным. В центре мозговой зоны в виде гомогенных образований круглой или овальной формы, окрашиваемых эозином в розовый цвет обнаруживались тельца

Гассалья. Дольки тимуса были окружены соединительнотканной капсулой, от которой внутрь органа проходили тонкие прослойки рыхлой соединительной ткани с сосудами и нервами. У птиц опытной группы на 3-й, 7-й, 14-й и 21-й дни после вакцинации элементов коркового и мозгового вещества часто выявлялись очаговые лимфоцитарные пролифераты (рис. 3 а).

В результате граница между корковым и мозговым веществом была неровной. Отмечено также в мозговом веществе значительное увеличение числа и размеров телец Гассалья.

При гистологическом исследовании фабрициевой бursы интактных цыплят в течение эксперимента было установлено, что стенка органа состоит из слизистой, мышечной и серозной оболочек. Слизистая оболочка имела первичные и вторичные складки, покрытые многоядным призматическим эпителием. В складках слизистой оболочки визуализировались многочисленные лимфоидные узелки, состоящие из корковой и мозговой зоны. Корковая зона, расположенная на периферии лимфоидного узелка, представляла собой ретикулярную ткань, заполненную малыми и средними лимфоцитами. Мозговая зона, расположенная в центре узелка, была образована эпителиальной тканью и содержала преимущественно средние и большие лимфоциты. Зоны узелка отделены друг от друга базальной мембраной и слоем эпителиоцитов. В собственной пластинке слизистой оболочки выявлялись микро- и макрофаги, бластные и зрелые формы лимфоцитов. На 14-й и 21-й дни после иммунизации у птиц опытной группы отмечено увеличение размеров лимфоидных узелков (рис. 3 б), и расширение их корковой зоны.

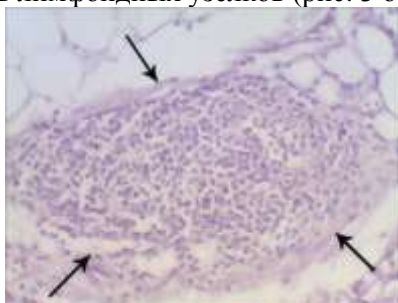


Рис. 1 а) Микрофото. Формирование лимфоидного узелка в ткани на месте введения вакцины цыпленка опытной группы на 14-й день после иммунизации против ИАЦ. Гематоксилин–эозин. Биомед-6. Ув.: x 480

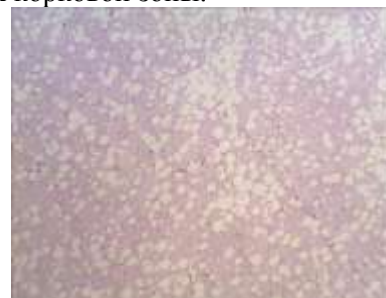


Рис. 1 б) Микрофото. Костный мозг 74-дневного цыпленка контрольной группы в состоянии нормы. Гематоксилин–эозин. Биомед-6. Ув.: x 120

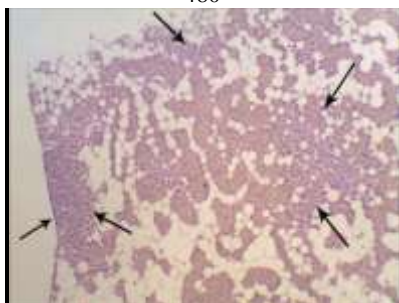


Рис. 2 а) Микрофото. Костный мозг цыпленка опытной группы на 14-й день после вакцинации против ИАЦ. Гиперплазия клеток лимфоцитарного ростка. Гематоксилин–эозин. Биомед-6. Ув.: x 120



Рис. 2 б) Микрофото. Тимус цыпленка контрольной группы на 14-й день эксперимента. Паренхима долек дифференцирована на корковое (кв) и мозговое (мв) вещество. Гематоксилин–эозин. Биомед-6. Ув.: x 120



Рис. 3 а) Микрофото. Гиперплазия тимоцитов в корковом веществе дольки тимуса цыпленка опытной группы на 14-й день после вакцинации против ИАЦ. Гематоксилин–эозин. Биомед-6. Ув.: x 120

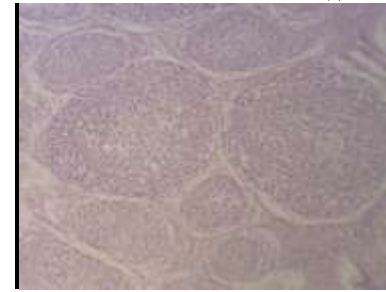


Рис. 3 б) Микрофото. Гиперплазия лимфоидных узелков фабрициевой бursы цыпленка опытной группы на 14-й день после вакцинации против ИАЦ. Гематоксилин–эозин. Биомед-6. Ув.: x 120

Во все сроки исследований селезенка цыплят контрольной группы отличалась однотипностью строения. Орган был покрыт соединительнотканной капсулой, от которой вглубь отходили перегородки (трабекулы). Паренхима селезенки была образована белой и красной пульпой. Белая пульпа была представлена диффузной лимфоидной тканью, а также лимфоидными узелками,

расположенными около артерий среднего калибра. Красная пульпа селезенки цыплят была образована пульпарными тяжами и пульпарными синусами. Пульпарные тяжи в основе содержали ретикулярную ткань. Между ретикулярными клетками находились эритроциты, зернистые и незернистые лейкоциты, а также плазмочиты на разных стадиях созревания. После введения вакцины против ИАЦ у птиц опытной группы на 14-й и 21-й дни отмечено увеличение числа лимфоцитов и плазматических клеток различной степени зрелости в пульпарных тяжах и периартериальных муфтах. Также было замечено одновременное увеличение размеров лимфоидных узелков.

Пищеводная (эзофагиальная) миндалина локализовалась на границе пищевода и железистого желудка, была образована тонким слоем соединительной ткани и покрыта однослойным плоским эпителием. Кроме того, были выявлены фрагменты жировой клетчатки с артериями, венами и нервами. Мышечная оболочка состоит из трех слоев: гладких миоцитов, которые располагались косо и циркулярно. Железы железистого желудка, окруженные тонкими прослойками мышечной пластинки слизистой оболочки занимали большую ее часть. Собственная пластинка и эпителиальный слой (эпителий многослойный плоский неороговевающий) образовали многочисленные складки, где располагались слизистые железы и лимфоидная ткань в виде диффузных скоплений и узелков. Площадь диффузной и узелковой лимфоидной ткани в пищеводной миндалине цыплят обеих групп была примерно одинаковой во все сроки исследований.

Лимфоидный дивертикул (дивертикул Меккеля) представлял собой полостной мешкообразный орган светло-серого цвета, располагался в грудобрюшной полости примерно по середине тощей кишки. Гистологически лимфоидный дивертикул состоял из слизистой, мышечной и серозной оболочек. Слизистая оболочка была покрыта 1-слойным цилиндрическим эпителием, собрана в складки, где находились либеркюновы (общекисечные железы) железы и лимфоидная ткань в виде диффузных скоплений и лимфоидных узелков. У птицы 1-й и 2-й групп количество и размеры узелков в разные сроки исследований были примерно одинаковыми.

Слепокишечные (цекальные) миндалины представляли собой парные овальные образования, выступающие в виде валиков у основания слепых кишок. При микроскопическом исследовании было выявлено, что в собственной пластинке и подслизистом слое слизистой оболочки располагались обширные участки диффузной лимфоидной ткани, а также многочисленные лимфоидные узелки. Развитие диффузной и узелковой лимфоидной ткани в течение эксперимента у цыплят 1-й и 2-й групп было примерно одинаковым.

Вирус-вакцина против ИАЦ из штамма «ИК-4» приготовлена с использованием культуры клеток MDCC-MSB1. Линия клеток MDCC-MSB1 получена из селезенки цыплят, больных болезнью Марека, представляют собой опухолевые Т-лимфоциты. В связи с этим существует потенциальная опасность появления остаточных онкогенных свойств при изготовлении вакцин с использованием данной линии клеток [1]. Следует отметить, во все сроки исследований нами не выявлены характерные для болезни Марека морфологические изменения в органах и тканях цыплят 1-й группы.

Заключение

Полученные результаты исследований свидетельствуют о том, что под влиянием вирус-вакцины против ИАЦ из штамма «ИК-4» в организме цыплят развиваются выраженные системные иммуноморфологические изменения, свидетельствующие о формировании напряженного поствакцинального иммунитета. Они характеризуются гиперплазией клеток лимфоидного ряда в красном костном мозге и тимусе, расширением корковой зоны лимфоидных узелков фабрициевой бursы, лимфатизацией селезенки, усилением бласттрансформации лимфоцитов и плазмочитарной реакции, формированием узелковой лимфоидной ткани в ткани на месте введения вакцины. Вакцинация цыплят против ИАЦ не вызывает развитие иммунопатологических процессов в органах и тканях птиц. Вирус-вакцина против ИАЦ из штамма «ИК-4», приготовленная с использованием культуры клеток MDCC-MSB1 не обладает остаточными онкогенными свойствами. Таким образом, полученные результаты исследований свидетельствуют о достаточной иммуногенности и безопасности вирус-вакцины из штамма «ИК-4» против ИАЦ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц / Б. У. Кэллек [и др.] ; под ред. Б.У. Кэллека, Х. Джона Барнса, Чарльза У. Биерда и др.; пер. с англ. И. Григорьева, С. Дорош, Н. Хрущева, И. Суворцев. – М.: АКВАРИУМ БУК, 2003. – С. 829–849.
2. Вирусная анемия – скрытая угроза промышленному птицеводству / А. С. Алиев [и др.] // Перспективное птицеводство. – 2012. – № 1. – С. 20–25.
3. Выделение и характеристика изолятов вируса инфекционной анемии цыплят / А. С. Алиев [и др.] // Ветеринария. – 2017. – № 11. – С. 7–14.
4. Диагностика и патоморфологические изменения в крови и органах иммунной системы птиц при инфекционной анемии : рекомендации / И. Н. Громов [и др.] // Витебск : Копицентр-АС-принт, 2013. – С. 16–33.
5. Инфекционная анемия цыплят : учебно-методическое пособие / А. С. Алиев [и др.]. – СПб., 2013. – 52 с.
6. Лилли, Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лилли ; под ред. В.В. Португалова ; пер. с англ. И.Б. Краснов [и др.]. – М.: Мир, 1969. – С. 577–592.

7. Меркулов, Г. А. Курс патологистологической техники / Г.А. Меркулов. – Ленинград : Медицина, 1969. – 432 с.
8. Микроскопическая техника: Руководство / Д. С. Саркисов [и др.] ; под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Петрова. – М. : Медицина, 1996. – 544 с.
9. Патогенность изолятов вируса инфекционной анемии цыплят / А. С. Алиев [и др.] // Ветеринария. – 2015. – № 5. – С. 20–26.
10. Серологический мониторинг инфекционной анемии цыплят и молекулярно-биологическая характеристика изолятов вируса / В. А. Лобанов [и др.]// Вестник РАСХН. – 2003. – № 2. – С. 66–69.