

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОСТНОГО МОЗГА ДЛЯ ОЦЕНКИ ИММУНОГЕННОСТИ ВАКЦИН И ПАТОГЕННОСТИ ВИРУСОВ У ЖИВОТНЫХ

Прудников В.С., Никитенко И.Г., Громов И.Н., Селиханова М.К.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Морфологическое исследование костного мозга способствует комплексному изучению системы иммунитета и определению иммунного статуса животных при болезнях, вакцинациях и иммунокоррекции.

Morphological examination of the bone marrow contribute to a comprehensive study of the immune system and to determine the immune status of the animals from diseases, vaccination and immunocorrection.

Ключевые слова: гистологическое исследование, костный мозг, вакцинация, лептоспироз, ньюкаслская болезнь, инфекционный бронхит, синдром снижения яйценоскости, инфекционная анемия цыплят, свиньи, куры.

Keywords: histological study, bone marrow, vaccination, leptospirosis, Newcastle disease, infectious bronchitis, Egg Drop Syndrome, chicken infectious anemia, pigs, hens.

Введение. Костный мозг является центральным органом кроветворения и иммунитета. Он также участвует в костеобразовательных процессах, депонировании крови, обмене белков, жиров, углеводов, витаминов и минеральных веществ в организме. В зависимости от выполняемой функции различают три стадии развития костного мозга, последовательно сменяющие друг друга: стадия остеобластического (костеобразовательного) костного мозга преобладает в эмбриональный период развития, стадия красного (кроветворного) костного мозга выполняет главную функцию образования всех клеток крови и иммунной системы, и желтого костного мозга, который появляется после рождения в диафизах трубчатых костей и постепенно замещает красный [3, 6].

Красный костный мозг представляет собой вещество темно-красного цвета, полужидкой консистенции. Содержится у взрослых животных в губчатом веществе костей свода черепа, ребер, грудины, в телах позвонков, эпифизах трубчатых костей. Строма его представляет собой связанную с эндоостом и кровеносными сосудами ретикулярную ткань (ретикулярные клетки, ретикулярные и коллагеновые волокна). Кровеносные сосуды костного мозга составляют до 50% его массы. Паренхима костного мозга представлена миелоидной тканью, которая содержит основную популяцию стволовых кроветворных клеток, являющуюся родоначальницей всех клеток крови и лимфы.

Гемопоэтические клетки, как правило, располагаются островками, образуя скопления бластных, дифференцирующихся и зрелых форм эритроцитопоэтического, гранулоцитопоэтического, лимфоидного и мегакариоцитарно-тромбоцитопоэтического рядов. Дифференцирующиеся лимфоциты и моноциты расположены преимущественно вблизи кровеносных сосудов в виде единичных клеток или мономорфных скоплений. Наиболее интенсивное кроветворение отмечается вблизи эндооста, где более высокая концентрация стволовых клеток. Созревающие клетки поступают в синусоидные (венозные) капилляры костного мозга, где некоторое время дозревают, а затем выносятся в общий кровоток и заселяют иммунокомпетентные органы [3, 4, 6].

Исследование костного мозга является неотъемлемой частью комплексного изучения системы иммунитета и определения иммунного статуса животных при болезнях, вакцинациях и иммунокоррекции.

Целью наших исследований явилось морфологическое исследование костного мозга животных, используя при этом способ приготовления гистологических препаратов, разработанный сотрудниками кафедры патологической анатомии и гистологии УО ВГАВМ, который позволяет наилучшим образом выявлять и дифференцировать все структурные элементы органа.

Материалы и методы исследований. Исследования состояли из трех опытов. В 1 опыте нами было проведено морфологическое исследование костного мозга 60 свиней (в возрасте 6 месяцев, подобранных по принципу аналогов и разделенных на 5 групп по 12 животных), иммунизированных инактивированной вакциной против лептоспироза с различными адъювантами и иммуностимуляторами. Свиней 1-й группы иммунизировали вакциной, содержащей в качестве адъюванта гидроокись алюминия (вакцина гидроокисьалюминиевая). Животным 2-й группы вводили вакцину, в которой в качестве адъюванта использовали 30%-й раствор натрия тиосульфата (вакцина тиосульфатная). Свиней 3-й группы иммунизировали вакциной, содержащей в качестве адъюванта минеральное масло «Маркол-52» в смеси с эмульгатором (вакцина эмульгированная). Животным 4-й группы вводили ту же вакцину, что и свиньям 3-й группы, с добавлением в нее натрия тиосульфата до 30%-ной концентрации (вакцина эмульгированная совместно с натрия тиосульфатом). Все опытные образцы вакцины были изготовлены в условиях ОАО «БелВитУнифарм». Интактные животные 5-й группы служили контролем. На 7-й, 14-й и 21-й дни после вакцинации производили убой 4 животных из каждой группы, для проведения морфологических исследований отбирали кусочки грудной кости.

Во 2 опыте нами были изучены морфологические изменения в костном мозге ремонтного молодняка кур при парентеральной иммунизации их против ньюкаслской болезни (НБ), инфекционного бронхита кур (ИБК) и синдрома снижения яйценоскости-76 (ССЯ-76) жидкой инактивированной ассоциированной эмульсин-вакциной, разработанной в ИЭВ им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси. Всего было использовано 400 птиц 110-дневного возраста, подобранных по принципу аналогов и разделенных на 2 группы по 200 птиц в каждой. Молодняк кур 1 (опытной) группы иммунизировали против НБ, ИБК и ССЯ. Вакцину вводили согласно инструкции по ее

применению, в 110-дневном возрасте, однократно, внутримышечно, в область грудных мышц, в дозе 0,5 мл. Интактная птица 2 группы служила контролем. За птицей было установлено клиническое наблюдение. На 3, 7, 14, 21 и 28 дни после вакцинации по 4-5 птиц из каждой группы убивали. Для морфологических исследований от птиц отбирали кусочки большеберцовой кости.

В 3 опыте нами были изучены структурные изменения в костном мозге цыплят при экспериментальном заражении вирусом инфекционной анемии (ИАЦ). Исследования были проведены на СПФ-цыплятах суточного возраста. Птица была подобрана по принципу аналогов и разделена на 2 группы, по 15 цыплят в каждой. Цыплят 1 группы в суточном возрасте внутримышечно заражали изолятом «Краснодарский» («АБИМ») вируса инфекционной анемии. Интактные цыплята 2 группы служили контролем. За всей птицей было установлено клиническое наблюдение. На 21 день после заражения цыплят убивали для проведения морфологических исследований костного мозга.

Приготовление гистологических препаратов костного мозга осуществляли следующим образом.

1. Отбор материала. У млекопитающих отбирали кусочки грудины, ребер, костей свода черепа, тел позвонков, эпифизов трубчатых костей, а у птиц – кусочки бедренной, большеберцовой и плюснево-заплюсневой костей.

2. Фиксация кусочков 10%-м раствором формалина в течение 24 часов.

3. Декальцинация костной ткани 1 н раствором уксусной кислоты до ее размягчения.

4. Обезвоживание в спиртах возрастающей концентрации и заливка в парафин общепринятым методом.

5. Изготовление срезов на санном или ротационном микротоме общепринятым методом.

6. Депарафинирование в ксилоле и спирте общепринятым методом.

7. Окраска стандартной краской Май-Грюнвальда в течение 3 минут.

8. Ополаскивание срезов в дистиллированной воде, подкисленной уксусной кислотой (2-3 капли ледяной уксусной кислоты на 200 мл воды), до тех пор, пока будут отходить облачка азура (20-30 сек).

9. Окраска срезов рабочим раствором краски Романовского-Гимза в течение 10 минут.

10. Ополаскивание гистосрезов в водопроводной воде в течение 1 минуты.

11. Обезвоживание в 96° спирте в течение 1 минуты.

12. Просветление в ксилоле в течение 1 минуты.

13. Заключение в полистирол [5].

При морфологическом изучении препаратов изучали гистоархитектонику органа, выявляли и дифференцировали структурные элементы, миелограмму выводили на основании дифференцированного подсчета 1000 клеток, придерживаясь унитарной теории кроветворения, предложенной И.Л. Чертковым и А.П. Воробьевым, руководствуясь морфологическим описанием клеток кроветворных органов и крови по И.М. Карпутью. Наряду с оценкой миелограммы выводили парциальные формулы различных групп клеток костного мозга [1, 2].

Результаты исследований. Проведенные исследования красного костного мозга свиней на фоне вакцинации против лептоспироза, ремонтного молодняка кур при вакцинации против инфекционного бронхита, ньюкаслской болезни и синдрома снижения яйценоскости, а также здоровых и больных инфекционной анемией цыплят показали, что использование данного способа приготовления гистологического препарата костного мозга позволяет выявить клетки лимфоидного (лимфоциты, плазматические клетки), миелоидного (нейтрофильные, эозинофильные и псевдоэозинофильные, базофильные гранулоциты и моноциты), эритроидного (базофильные, полихроматофильные и оксифильные нормоциты) и мегакариоцитарно-тромбоцитарного рядов на разных стадиях созревания, а также элементы костной и ретикулярной тканей, эндотелиальные клетки сосудов, фибробласты соединительной ткани, липоциты.

Результаты исследований в 1 опыте показали, что в костном мозге свиней, иммунизированных против лептоспироза, на 7-й день после вакцинации наблюдается повышение на 20,2–42,8% содержания лимфоцитов и в 3,8 раза – плазматических клеток, увеличение в 1,9 раза лейкоэритробластического индекса и снижение в 1,3–1,8 раза общего количества клеток эритробластического ряда по сравнению с контролем. При иммунизации эмульгированной вакциной без и совместно с натрия тиосульфатом отмечается увеличение на 20,1 и 10,5% соответственно количества клеток миелобластического ряда, преимущественно за счет клеток нейтрофильной группы, отмечается повышение в 1,6 раза содержания моноцитов и увеличение в 1,4 и 1,5 раза соответственно костномозгового индекса созревания нейтрофилов по сравнению с интактными животными. На 14-й день после иммунизации в миелограмме вакцинированных свиней всех групп наблюдается повышение на 14,1–27,0% общего количества клеток миелобластического ряда, в основном за счет клеток нейтрофильной группы, увеличение в 4,0–5,9 раза содержания плазматических клеток и уменьшение в 1,5 раза общего количества клеток эритроидного ряда по сравнению с контрольными данными. Применение гидроокисьалюминиевой вакцины способствует увеличению в 1,6 раза содержания мегакариоцитов по отношению к интактным животным. Иммунизация свиней эмульгированной вакциной без и совместно с натрия тиосульфатом сопровождается уменьшением на 35,2% содержания клеток эозинофильной группы и увеличением в 1,4 раза индекса созревания нейтрофилов по отношению к контролю. При использовании гидроокисьалюминиевой, эмульгированной без и совместно с натрия тиосульфатом вакцины отмечается по сравнению с невакцинированными животными увеличение в 1,8–2,3 раза лейкоэритробластического индекса. У свиней, иммунизированных эмульгированной вакциной, во все сроки исследований наблюдается увеличение в 3,2 раза содержания базофилов по отношению к контролю. На 21-й день после вакцинации в миелограмме подопытных свиней отмечается выравнивание показателей миело- и эритробластического рядов, за исключением животных, иммунизированных эмульгированной вакциной, у которых наблюдается увеличение на 23,0% общего количества нейтрофилов, снижение на 30,2% содержания клеток эритробластического ряда, а также увеличение в 4,1 раза количества плазматических клеток по сравнению с интактными животными. У вакцинированных свиней всех групп отмечается повышение в 1,1–1,6 раза костномозгового индекса созревания нейтрофилов по отношению к контролю.

При гистологическом исследовании костного мозга молодняка кур во 2 опыте нами установлено, что у птиц 1 группы на 3 день после вакцинации против НБ, ИБК и ССЯ-76 выявлено достоверное увеличение в 1,2-1,3 раза числа псевдозозинофилов и тромбоцитов различной степени зрелости по сравнению с контролем. Одновременно происходило повышение лейкоэритробластического индекса в 1,3 раза ($P < 0,05$). В то же время содержание клеток эритроцитарного ряда у вакцинированного молодняка кур достоверно уменьшалось на 20% по сравнению с птицей контрольной группы. Число моноцитов, плазмоцитов и лимфоцитов у птиц 1 и 2 групп было примерно одинаковым. На 7 день эксперимента общее количество зернистых лейкоцитов в костном мозге вакцинированного молодняка кур достоверно превышало контрольные данные в 1,2-1,4 раза, а лейкоэритробластический индекс – в 1,3 раза. Содержание клеток эритроцитарного ряда у подопытных птиц было по-прежнему меньше, чем в контроле ($P < 0,05$). Через 14 дней после проведения вакцинации в костном мозге птиц 1 группы количество клеток псевдозозинофильного и зозинофильного рядов снижалось по сравнению с предыдущим сроком исследований, а содержание эритроцитов, наоборот, увеличивалось. Лейкоэритробластический индекс у иммунизированного молодняка кур снижался по сравнению с исходными данными. В отдаленные сроки (на 21 и 28 дни после ассоциированной вакцинации) показатели миелограммы и парциальные формулы различных групп костномозговых клеток у птиц 1 и 2 групп были примерно одинаковыми.

Результаты исследований в 3 опыте показали, что в миелограмме цыплят на 21 день после заражения вирусом ИАЦ происходило достоверное уменьшение в 1,3 раза общего количества гранулоцитов по сравнению с контролем. Изменение данного показателя происходило в основном за счет клеток псевдозозинофильного ряда. Общее количество эритробластических клеток в миелограмме подопытных птиц уменьшалось с $47,00 \pm 1,18$ % (контроль) до $33,15 \pm 1,24$ % ($P < 0,001$), а число лимфоцитов, наоборот, увеличивалось в 2 раза ($P < 0,01$). Различия в показателях по тромбоцитарному и моноцитарному рядам клеток между 1 и 2 группами птицы были недостоверными. В костном мозге птиц опытной группы отмечено также снижение лейкоэритробластического индекса в 1,8 раза ($P < 0,01$), а также индексов созревания эозинофилов в 1,4 раза ($P < 0,05$) и псевдозозинофилов в 1,3 раза ($P > 0,05$) по сравнению с контрольными значениями.

Заключение. Таким образом, проведенные нами исследования показали, что приготовление препаратов костного мозга данным способом обеспечивает наилучшую окраску всех структур клетки (ядро, цитоплазма, зернистость гранулоцитов), что позволяет провести дифференцировку различных генераций гемопоэтических клеток животных. Нами также было установлено, что в костном мозге иммунизированных против лептоспироза свиней увеличивается, по сравнению с интактными животными, в 3,0–5,9 раза число плазматических клеток, на 20,2–42,8% повышается содержание лимфоцитов, на 10,5–27,0% – количество миелобластических клеток, в 1,9 раза возрастает лейкоэритробластический индекс, в 1,1–1,6 раза усиливается костномозговой индекс созревания нейтрофилов, что указывает на активную гиперплазию и омоложение клеток белой крови. Морфологическая перестройка костного мозга молодняка кур в ответ на введение инактивированной ассоциированной вакцины против НБ, ИБК и ССЯ характеризуется тромбоцитозом, псевдозозинофилией, зозинофилией, увеличением общего количества зернистых лейкоцитов и лейкоэритробластического индекса. Выявлено, что экспериментальное заражение цыплят вирусом ИАЦ приводит к аплазии миелоидной ткани, что проявляется достоверным уменьшением количества клеток эритроцитарного и гранулоцитарного рядов, снижением лейкоэритробластического индекса, а также индексов созревания эозинофилов и псевдозозинофилов.

Литература. 1. Карпуть, И.М. Гематологический атлас сельскохозяйственных животных / И.М. Карпуть. – Минск : Ураджай, 1986. – 183 с. 2. Коленкин, С.М. Основные правила исследования пунктата костного мозга / С.М. Коленкин, А.И. Михеева // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – № 2. – С. 41–43. 3. Сапин, М.Р. Иммунная система человека / М.Р. Сапин, Л.Е. Эттингер. – М. : Медицина, 1996. – 304 с. 4. Соколов, В.И. Цитология, гистология, эмбриология / В.И. Соколов, Е.И. Чумасов. – М. : «КолосС», 2004. – 351 с. 5. Способ подготовки костного мозга для гистологического исследования : заявка G 01N 33/48 Респ. Беларусь, МПК / В.С. Прудников, И.Н. Громов, И.Г. Никитенко ; заявитель УО ВГАВМ. – № а 20111638 ; заявл. 02.12.11 ; опубл. 30.08.12 // Афиційны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2012. – № 4. – С. 34. 6. Хрусталева, И.В. Иммунокомпетентные структуры млекопитающих и птиц новорожденного периода / И.В. Хрусталева, Б.В. Криштофорова, В.В. Лемещенко // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2007. – № 5. – С. 49–54.

Статья передана в печать 11.03.2015 г.

УДК 619:636.8:616.993.192.6ББ(477.52-21)

ИЗУЧЕНИЕ БАБЕЗИОЗА КОШЕК В Г. СУМЫ, УКРАИНА

*Решетило А. И., **Никифорова О. В., ***Кульшин В.Е., *Ясиновская О. Н.

*Сумский национальный аграрный университет, г. Сумы, Украина,

**Харьковская государственная зооветеринарная академия, г. Харьков, Украина,

***Харьковская медицинская академия последипломного образования, лаборатория «Вирола», г. Харьков, Украина

Бабезиоз кошек имеет тенденцию к распространению в г. Сумы, Украина. Болезнь характеризуется ярко выраженной сезонностью с максимальным пиком в мае, чаще болеют беспородные животные – 56,90%, возрастом от 6 мес. до 3 лет – 44,83%, коты, нежели кошки – 67,24 и 32,76%, соответственно. Полимеразная цепная реакция – более чувствительный метод диагностики бабезиоза кошек, чем микроскопия тонких мазков крови.